



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**

**Elodie LABIT**

**le** vendredi 9 septembre 2016

**Titre :**

Le tissu adipeux :  
Tissu modèle pour étudier le lien entre organisation et fonction  
ainsi que la régénération tissulaire

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED BSB : Physiopathologie

**Unité de recherche :**

STROMALab

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Pr. Anne Lorsignol

Dr. Cécile Berthézène

**Jury :**

Pr. Bruno Fève

Dr. Jean-Thomas Vilquin

Pr. Louis Casteilla

Dr. Bruno Guiard



# REMERCIEMENTS

---



Tout d'abord, je remercie Messieurs **Bruno Feve**, **Jean-Thomas Vilquin** et **Bruno Guiard** de l'intérêt qu'ils ont porté à ce manuscrit en acceptant de l'évaluer et d'y apporter leur esprit critique !

**Anne**, et dire que notre chemin a commencé, en Master 1, il y a 6 ans, déjà : nos discussions tardives, votre didactique, votre passion et votre envie de partager m'ont révélée et m'ont donné envie de continuer l'aventure avec vous! Merci pour votre confiance, pour votre temps et vos conseils durant les 3 dernières (longues) semaines de rédaction de thèse.

**Cécile**, tu te rappelles de cette phrase que tu m'as dite au début de thèse : « être chercheur : c'est créer, inventer, être artiste », elle a été mon second déclic ... Merci de m'avoir laissée être cette mini-artiste ! J'ai adoré partager avec toi cette riche expérience du premier congrès, même si j'ai dormi dans le hall de l'hôtel plutôt que dans notre chambre ☺

**Louis**, je ne sais pas si quelqu'un a déjà décrit l'œdipe scientifique ! Et bien moi, je vais le faire : l'œdipe scientifique, je le définirais comme : i) quelques « coups de pieds au cul » (des fois épuisant, fatigant, vous poussant dans vos retranchements), ii) des dizaines et dizaines de soirées à discuter, échanger, iii) beaucoup d'humour iv) des dogmes foutus en l'air, visités, re-visités par quelqu'un de passionné et passionnant...

Sans vous, aujourd'hui je ne serais pas là ; c'est évident, sans vous, je n'aurais aucune envie d'être là ! Merci de m'avoir donné l'impression d'être une privilégiée ayant pu accéder à votre douce folie scientifique ! Merci de m'avoir rendue (un peu plus) curieuse, merci de m'avoir donné l'occasion de rester naïve, merci de m'avoir « endurcie » tant scientifiquement que personnellement et merci de m'avoir initiée au renversement des dogmes ! Merci Louis, merci !

Tous les membres de STROMALab grâce à qui cette thèse a été légère, merci : **Anne P**, pour nos discussions, nos rando et nos repas Pasta Party ☺, **Sandra** pour les discussions scientifiques et les moments perso ; **Jean-Gérard** j'adore te chambrer quand tu fais la tête, **Manue** pour l'initiation à la biomol, **Nico** pour tes « bonne année », **Isabelle A** pour tes conseils, ta bonne humeur constante, **Jenny** pour ta douceur, gentillesse, conseils, et nos discussions, **Val** pour les moments conviviaux et les nombreux conseils, **Mélanie** pour ta douceur, **Luc** pour avoir souvent participer à la STROMA vie sociale, **Béa** d'avoir été ma voisine de bureau et pour m'avoir quelques fois pousser à bout, ce qui m'a sûrement permis d'obtenir mon concours de l'école doctorale, **Mathieu** pour les week ends partagés au labo, **Marion D** pour ta sérénité, **Marie-Laure** pour ta gaieté, **Elo « a »** pour ta patience (mails et scan qui ne te sont destinés), ta gentillesse et ta bonne humeur, **Julie-Anne** pour tes



encouragements, **Yannick** pour ton optimisme et pour avoir ouvert le chemin, **Guillaume** pour ta folie, nos longues discussions scientifico-politico-philosophique, qu'est ce que tu m'as fait rire, **Pascalou** pour ton esprit intemporellement jeune et fou, **Alain** pour les bon souvenirs d'avant, **Benoit** pour ton aide dans les moments perso pas faciles, ta bonne humeur et ton accessibilité constante ... **Isabelle R** pour ta gentillesse, nos discussions et les projets toujours en cours ☺ ! **Delphine**, ma pauvre Delphine, je t'en ai fait voir de toutes les couleurs niveau gestion ! Quel plaisir de partager ces deux années avec toi et ces camemberts grillés ! **Suzy**, pour avoir pris le relais de Delphine et d'avoir été aussi efficace administrativement ☺ Merci aussi à mes plus chères collaboratrices, **mes petites souris** - que vous ayez été blanches ou noires- pour votre coopération (quasi) sans faille et votre dévouement pour la science : grâce à vous la régénération chez l'homme n'est pas si loin : merci pour nous !

Mais aussi,

**Lise**, on en a partagés des fichiers graphpad, des mails, des matinées, des soirées, des idées, des concepts ! Il paraît que j'ai écrit cette thèse pour toi ☺ ... Je te fais confiance et te laisse donc la garde de « mon » bébé pour un temps, ce projet, qui est le plus trippant des projets ! Eclate-toi !

**Corinne**, toujours présente pour proposer ton aide ! Tout a été chouette avec toi : les discussions scientifiques comme les discussion perso ! Ne change pas !

**Audrey C**, ta douceur, ta rigueur et ta détermination m'impressionnent. Je me souviens de ce moment en salle de culture souris (en M2 ?) où tu m'as dit qu'on pouvait être douce, gentille tout en gardant sa détermination et en ne se laissant pas marcher sur les pieds !

**Fred**, pour l'ensemble de ton œuvre ! Je n'oublierai pas mon premier congrès avec toi et Cécile, moment privilégié de cette thèse ! Je souris aussi en pensant à notre envie commune de s'impliquer dans les événements de vulgarisation scientifique, c'était chouette ! Merci pour nos discussions scientifiques très riches, les Fiesta partagées, sans oublier ton aide notamment, quand j'étais seule face à la soumission du premier article !

**Audrey, Sophie**, mes grandes sœurs, vous êtes contentes hein ? Merci pour la découverte des films en couleurs ! Merci pour vos conseils, scientifiques mais également perso ! **Audrey**, toujours une oreille attentive, oreille étant capable de donner coup de pieds au cul (ouai c'est vrai qu'anatomiquement, c'est compliqué) et bons conseils, ils ont été (sont et





restent) tellement importants ... Grâce à toi, mon dernier déclic a eu lieu (ouf !). J'espère donc que pendant tes prochaines vacances, tu viendras me voir, là où mon anglais m'aura amenée ☺

**Coralie**, thank you for your insightful comments ! Merci pour tes encouragements qui perdurent depuis le M2 ! Merci pour le bénévolat et ton implication : les corrections d'abstracts et de poster, entre autre ! Un jour, j'aimerai (VRAIMENT, VRAIMENT) être comme toi ... Merci pour ta super bonne humeur, ta simplicité, tes conseils, ta rigueur et ta folie scientifique, ta passion et évidemment pour le théâtre ;-)

**Mireille**, merci pour ta patience, particulièrement avec les souris! Merci d'avoir respecté les craintes et d'y être allée lentement ! Malgré ça, nous nous n'oublierons pas cette matinée de juillet, (humide !!!), queue dans la main ! Merci de ton oreille attentive et pour tes conseils ! Enfin, durant cette quatrième année de thèse, j'ai adoré travaillé avec toi !

Tu as été ma maman (et c'est un compliment !!!!) de substitution dans ce premier monde d'adultes!

**Christophe**, mon chef, mon frère! Mais quelle patience : tu as vérifié mes calculs, tu m'as initié à la chirurgie, tu as été à mes côtés pour les premières i.p, puis les premiers sacrifices, les premières IHC, les premières (et pas que) séances au microscope (épifluo, confocal, biphoton puis feuille de lumière) ! Et puis tu as également été mon premier ami laborantin! Merci pour ta patience, ta gentillesse, ta compréhension, le partage de mes doutes et surtout merci pour ton amitié ! Qu'ils étaient chouettes ces midis au soleil avenue Jules Julien .....

**Vincent**, mon premier stagiaire ... Ah ah ah ah et quel stagiaire ... Le mec le plus overbooké de STROMALab, voire de Ranguel, voire de Toulouse ... Il est en thèse, le petit maintenant ... Souvent en train de râler car TROP OVERBOOKE mais toujours marrant et présent ! C'était chouette de partager ce bureau avec toi et d'attendre que le soir vienne ... pour parler de science (bien entendu !). Vive la thèse, Vive le champagne !

**Clément**, j'ai par dessus tout aimé tes compliments (on m'a conseillé de ne pas les détailler), un peu moins les insultes : piou-piou, bonasse, frissette (oh il y en a que trois ...) ! J'ai tellement apprécié ta bonne humeur, ta prise de recul, ta partialité, ta générosité, bref ton amitié ... Il y aura toujours un peu de Rhum Arrangé chez moi, pour TOI !



**Quentin, Célia, Marion B,** la relève pour le STROMA Organisation est là ... Toujours de bons moments avec vous, qu'ils soient scientifiques ou perso ! Pourvu qu'il y en ait plein d'autres !

**Amandine,** malheureusement, on aura partagé qu'une seule année ... Mais ça n'a pas empêché que l'on passe de chouettes moments ensemble, souvent ressourçant quand le boulot était plutôt pesant (midi au Relais H, petite pause en salle sacrifice, ...) les dimanches ou les soirs, tard ! C'était bien ... Je suis trop fière d'avoir une copine qui a eu son concours CNRS du premier coup (et amplement mérité) : encore félicitations ! Merci pour le temps que tu m'as accordé pour les corrections d'anglais d'abstract et de posters, nos discu scientifiques (et perso) et d'avoir impulsé le dernier déclic (« t'as quoi à perdre ? »). J'espère un jour avoir le plaisir de travailler avec toi ☺

**Vaness, Jerem, Marion T, EloLu,** ah ah ah que c'était le bon temps, ce temps partagé avec vous : pendant les temps d'incub, pendant les repas au labo, pendant l'élaboration d'un calendrier de gourmandise, pendant l'organisation de STROMAFiesta, pendant ces nombreuses soirées, ces barbeuc, et les mariages ... Puis y en a un qui part, puis l'autre, puis l'autre ... Chaque fois, c'est un déchirement ... Heureusement, l'amitié perdure ! Il n'y a pas à dire, les collègues de travail qui deviennent des amis, c'est pour la vie !

**EloLu,** que serais-je devenue sans toi ? Tu m'as appris à devenir moi-même au sein du laboratoire ! Ainsi on a pu exprimer ensemble notre bonne humeur, notre côté fêtard, nos besoin de chaussures, et puis un peu de sciences (ben ouai, quand même) ! Tu m'as appris à persévérer : fait faire un semi marathon, fréquenter à un rythme (soutenu) les salles de la gym suédoise ! J'ai aimé me lever à 5h30 pour venir travailler au labo avec toi, j'ai aimé nos soirées après 18h, au labo à galérer à ouvrir une bouteille de bière ! J'ai adoré ne pas prendre de vacances les étés, puisque j'étais avec toi ... Mais surtout tu m'as appris à relativiser et aimer encore plus la vie, et ce même si ...

Merci mon Elo pour ces doux moments de folies (perso et scientifiques) et d'épanouissements ! Continue à aimer la vie (et à me la faire aimer) !!!

**Marie,** ma meilleure amie, on se le dit depuis 8 ans : on est bien plus forte à deux ! Qui aurait cru qu'on pouvait tomber en amitié d'amour sur les bancs de la FAC de bio ? Tu es sans doute, celle à qui je dois le plus cette thèse ... Ma « réussite » n'existerait pas si TOI, mon scripte, si TOI, la perfectionniste, si TOI, l'ultra-persévérante, si TOI, mon fournisseur de



stabilo 8 faces, si TOI, ma meilleure amie, n'avais pas été à mes côtés pendant ces 8 longues années scientifiques ! Rappelle toi de ce bonheur partagé le 17 juillet 2012 ! N'oublions pas tous nos moments partagés et nous n'imaginons pas la quantité de moments qu'il nous reste à partager ! ...

**Camillou**, merci pour nos discussions scientifico-littéraire ... Grâce à toi, je m'ouvre à d'autres sciences à chacun de nos rendez-vous ! Merci pour tous les conseils et d'avoir toujours été une oreille attentive, ainsi que d'être que ma principale source d'optimisme !

**Bastien, Yo, Molmer**, merci pour votre amitié, votre soutien, vos regards passionnés, époustouflés (même à 3g) lorsque je vous parle de régénération, de cellules souches et de tissu adipeux ! N'oubliez pas qu'il faut souffrir !!!

A mes amies de toujours, **Rox, Marco, Lulu, Kropi, Ninie, Célia** : vous en avez acceptés des emplois du temps trop chargés, des soirées annulées à cause d'une acquisition au microscope un vendredi soir, ou des week-end écourtés à cause d'opération de lipectomie programmée au dernier moment. J'ai toujours bien choisi mes amis ☺

**Ju**, d'être la grande sœur que je n'ai jamais eu (et tout ce qui avec : ta confiance, ton amour, tes encouragements, ...) et d'avoir cru en moi pour ce rôle de marraine.

Mes 2 princesses, **Emma et Clara** ! Souvent quand ca n'allait pas, je pensais à nos moments complices, à nos fou-rires, à votre curiosité, à votre folie ainsi que nos moments d'innocence qu'on vivrait le week end ! Je vous ai souvent vulgarisé mes histoires de cellules souches (« les billes roses ») et de pattes qui repoussent (« berk, c'est dégueu ces bêtes ») chez la salamandre ! Il est un peu pour vous ce travail !

**Romain**, qui aurait cru qu'un jour, après avoir partagé notre enfance, notre adolescence, nos bêtises, nos anniversaires, nos cabanes à La Manon, nos déboires amoureux, ... on partagerait -24 ans après t'avoir coupé la langue- ce type de discussion sur les nanoparticules et leur potentiel intérêt au cours de la régénération, autour d'un feu de bois ? Qui ?  
!!! Vive les faux cousins et tout ce que cela implique !!!

**Pauline**, (je le fais en français, car tu y es bien meilleure que moi en anglais !) le même parfum, et bientôt le même métier ... je suis contente que tu aimes la biologie aussi ! Bientôt, on devrait se voir plus souvent (ici ou là-bas), et j'en suis bien contente. I miss you !



**Tonton**, grâce à ton expatriation, j'ai découvert le Canada et je l'ai aimé. C'est sûrement parce que tu y es parti y construire ta jolie vie, que j'ai à mon tour envie d'y partir. Merci de m'avoir soutenue et encouragée depuis toutes ces années ... Merci aussi d'être venu en France à chaque fois que je pensais passer ma thèse et d'être de nouveau là, mais cette fois, pour le vrai jour J !!!!!

**Lu**, merci de t'être intéressée à la Salamandre mais avant tout, merci de m'avoir supporté comme maitresse pendant 10 ans ... Grâce à toi, est née l'une de mes vocations ! Je crois en toi pour trouver ton chemin et t'y épanouir ... Il semblerait que tu sois sur la bonne voie !

Mes **grands parents**, vous avez relevé le défi : rester en pleine forme jusqu'à la fin de cette thèse ! Merci de m'avoir écoutée, de m'avoir soutenue, de m'avoir conseillée, d'avoir été passionné par tout ce que je vous ai raconté et de faire chacune de mes découvertes, une joie !

Évidemment, **papa, maman** ! Merci de m'avoir laissée m'envoler loin de vous à 17 ans, merci de m'avoir poussée, puis d'avoir cru en moi, merci de m'avoir aidée (dans tout, pour tout), merci d'avoir été aussi patient et merci d'être fier de moi ! Si je suis là, c'est grâce à vous ! Merci pour la transmission de vos valeurs et votre constante générosité ...

Ne doutez pas de votre titre « meilleur parent du monde » !

**Papa**, tu as tellement été investi et émerveillé par mes « découvertes » : toujours envie de comprendre, souvent en train de me suggérer de nouvelles pistes ! Ta curiosité et ton enthousiasme m'ont fait tellement de bien, ...

**Maman**, tu as su gérer mes détresses relationnelles, tu as su, comme d'habitude, m'écouter et me calmer pendant ces intenses années de sciences ! Bref, comme d'hab, tu es la meilleure des mamans !

**Larry**, tu as mis (BEAUCOUP) de gaieté, d'humour et d'amour dans cette (looonnnngueeee) période qu'a été l'élaboration de cette thèse. Tu es fou et optimiste. Tu es curieux et persévérant ! Tout semble plus léger et plus réalisable aujourd'hui, avec toi. C'est décidé : la vie (sérieuse) est bien plus marrante à trois (la science, toi et moi) : il paraît qu'elle nous attend ☺ ☺ ☺ et qu'elle nous amènera loin ☺ ☺ ☺ ☺ ☺ ☺!!!

Elo  
« i »





*On veut l'intensité sans le risque. C'est impossible. L'intensité c'est le saut dans le vide, la part d'inédit, ce qui n'a pas encore été écrit et qui pourtant en nous est en attente, de précisément ça.*

*La passion est une disposition qui naît en nous depuis l'enfance, que l'on peut faire croître ou diminuer mais totalement altérer, jamais.*

*Anne Dufourmantelle  
Eloge du Risque,*



# SOMMAIRE

---



**Chapitre 1 : De la fonctionnalité à l'organisation des tissus adipeux**

I.	<b>Les tissus adipeux (TA) : généralités</b>	p.16
	A. <b>Le TA blanc</b>	p.16
	B. <b>Le TA brun</b>	p.17
II.	<b>Les cellules du TA</b>	p.18
	A. <b>Les adipocytes</b>	p.18
	1. <i>Les adipocytes blancs</i>	p.18
	a) Stockage et mobilisation des réserves énergétiques sous forme lipidiques	p.18
	b) Fonction sécrétoire	p.19
	2. <i>Les adipocytes bruns</i>	p.20
	3. <i>L'adipocyte beige : chimère entre l'adipocyte blanc et l'adipocyte brun</i>	p.20
	B. <b>Les progéniteurs adipocytaires</b>	p.20
	1. <i>Les progéniteurs blancs : renouvellement tissulaire et perspectives en médecine régénérative</i>	
	2. <i>Les progéniteurs adipocytaires bruns</i>	
	3. <i>Les progéniteurs beiges</i>	
	C. <b>Les cellules immunitaires</b>	p.24
III.	<b>Organisation des TA</b>	p.26
	A. <b>Localisation des différents dépôts adipeux</b>	p.26
	1. <i>Les différents TA blanc</i>	p.26
	2. <i>Les TA bruns</i>	p.27
	B. <b>Structure des TA</b>	p.28
	1. <i>Lobules et ganglions lymphatiques</i>	p.28
	2. <i>L'innervation des TA</i>	p.28
	a) L'innervation du TA blanc : activation de la lipolyse	p.28
	b) L'innervation du TA brun : activation de la thermogénèse	p.29
	3. <i>La vascularisation des TA</i>	p.31
	C. <b>Mise en place des TA</b>	p.31
IV.	<b>Plasticité des TA</b>	p.32
	A. <b>Surdéveloppement du TA blanc lors de l'obésité</b>	p.32
	B. <b>Emergence d'un TA brun dans un TA blanc</b>	p.33
	C. <b>Forte activation du TA brun lors de la cachexie</b>	p.33
	D. <b>Comportements des TA après lipectomie</b>	p.33
	E. <b>Le TA en chirurgie reconstructrice</b>	p.34



<b>Chapitre 2 : La régénération et ses principes</b>	p.35
<b>I. Réparation tissulaire: cicatrisation chez les mammifères adultes</b>	p.37
<b>A. Structure de la peau</b>	p.37
<b>B. Les différentes étapes de cicatrisation</b>	p.38
1. <i>L'hémostase</i>	p.38
2. <i>Inflammation</i>	p.39
a) Généralités	p.39
b) La production d'EOs par les cellules immunitaires	p.40
c) Phase pro-inflammatoire	p.42
d) Phase anti-inflammatoire	p.42
3. <i>Mise en place du tissu de granulation</i>	p.42
1. <i>Remodelage tissulaire</i>	p.43
<b>C. Cicatrisation et cellules souches</b>	p.44
 <b>II. Réparation tissulaire : régénération chez les vertébrés inférieurs, les poissons et les planaires : étude la régénération</b>	p.45
<b>A. Hémostase</b>	p.46
<b>B. Mise en place de la cape épithéliale</b>	p.46
<b>C. Formation de la blastema</b>	p.47
1. <i>Les différentes sources cellulaires de la blastema</i>	p.47
a) La dédifférenciation de cellules matures : étude de la blastema chez la salamandre	p.47
b) La blastema issue de stock de cellules indifférenciées : cas du planaire et de l'hydre	p.48
2. <i>La blastema : structure essentielle redondante et autonome</i>	p.48
<b>D. La production d'EO : à l'origine d'une signalisation « carrefour » de la régénération</b>	p.49
1. <i>L'importance des EOs au cours de la régénération</i>	p.49
2. <i>La production d'EOs permet la ré-innervation</i>	p.50
3. <i>La production d'EOs est responsable des vagues d'apoptose et de prolifération cellulaire</i>	p.50
<b>E. La réponse inflammatoire au cours de la régénération</b>	p.51
1. <i>Immunité innée au cours de la régénération</i>	p.51
2. <i>Immunité adaptative au cours de la régénération</i>	p.52
<b>F. L'innervation et l'identité de position des cellules souches de la blastema</b>	p.53
1. <i>Innervation au cours de la mise en place de la blastema</i>	p.53
2. <i>Identification de différentes molécules / neuropeptides dans la mise en place de la blastema</i>	p.54
3. <i>Cas particulier du couple nAG/Prod1</i>	p.54
 <b>III. Réparation chez le mammifère : quelques cas de régénération</b>	p.56
<b>A. Cas de l'embryon et du nouveau-né</b>	p.56





<b>B. La régénération chez le mammifère adulte : ce que nous apprennent le foie et le muscle</b>	p.57
1. <i>Le foie</i>	p.57
2. <i>Le muscle</i>	p.58
a) Nécrose des fibres musculaires	p.58
b) Immunité et régénération musculaire	p.59
c) Rôle des cellules souches au cours de la régénération musculaire	p.60
<b>C. La régénération chez le mammifère adulte : cas particulier de la souris MRL</b>	p.61
1. <i>MRL et pathologie auto-immune</i>	p.62
2. <i>MRL et régénération</i>	p.62
a) Régénération de l'oreille	p.62
b) Régénération du bout du doigt	p.63
c) Régénération cardiaque	p.63
d) Régénération et remodelage tissulaire : implication des métalloprotéases	p.63
e) MRL et innervation	p.64

### **Chapitre 3 : Les opioïdes** p.66

<b>I. Nociception et douleur : mécanismes et différences</b>	p.66
<b>A. Bases moléculaires de la nociception</b>	p.67
<b>B. Les neurones nociceptifs</b>	p.67
1. <i>les fibres afférentes myélinisées A <math>\delta</math></i>	p.68
2. <i>les fibres afférentes non myélinisées C</i>	p.68
<b>C. Les voies de la nociception</b>	p.69
<b>D. Inflammation et nociception</b>	p.70
<b>II. Les opioïdes</b>	p.72
<b>A. Ligands des récepteurs aux opioïdes</b>	p.72
1. <i>Les opiacés</i>	p.72
2. <i>Les ligands opioïdes endogènes</i>	p.73
a) Les enképhalines	p.73
b) Les endorphines	p.74
c) Les dynorphines	p.74
3. <i>Quelles sont les cellules qui synthétisent et libèrent les opioïdes ?</i>	p.74
<b>B. Les récepteurs aux opiacés et opioïdes</b>	p.75
1. <i>Historique</i>	p.75
2. <i>Structure des récepteurs</i>	p.75
3. <i>Localisation de ces récepteurs</i>	p.76
4. <i>Cascades intracellulaires de signalisation</i>	p.76
5. <i>Dimérisation des récepteurs aux opioïdes</i>	p.77
6. <i>Désensibilisation des récepteurs</i>	p.77
<b>C. Effets analgésiques des opioïdes</b>	p.78



<b>III. Opiïdes et réaction inflammatoire : implication dans le processus de cicatrisation et / ou de régénération ?</b>	p.81
<b>A. Les cellules immunitaires synthétisent et libèrent des opioïdes</b>	p.81
1. <i>Les cellules de l'immunité innée</i>	p.81
2. <i>Les cellules de l'immunité adaptative</i>	p.82
<b>B. Les opioïdes modulent l'inflammation</b>	p.82
1. <i>Via le récepteur kappa</i>	p.82
2. <i>Via le récepteur delta</i>	p.82
3. <i>Via le récepteur mu</i>	p.83
<b>C. Opiïdes et cicatrisation</b>	p.84
1. <i>Les opioïdes, accélérateurs de cicatrisation</i>	p.84
2. <i>Les opioïdes, retardateurs de cicatrisation</i>	p.85

---

<b>OBJECTIFS SCIENTIFIQUES</b>	p.87
--------------------------------	------

---

<b>PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES</b>	p.89
----------------------------------	------

---

<b><i>Chapitre 1 : Etude des relations « structure/fonction » au sein du tissu adipeux sous-cutané inguinal</i></b>	p.90
---	------

<b>I. Introduction</b>	p.90
<b>II. Résultats</b>	p.91
A. Organisation de l'innervation du tissu sous-cutané inguinal	p.91
B. Organisation tissulaire et fonction tissulaire au cours du brunissement (Article 1)	p.92
C. Lien entre organisation et fonction tissulaire au cours de la mise sous régime gras p.102	
D. Effet de l'âge sur l'organisation du tissu adipeux inguinal	p.102
<b>III. Discussion</b>	p.104
A. Relation « organisation / fonction » : extrapolation à d'autres tissus adipeux ?	p.104
B. Deux régions avec une organisation et fonction différentes : origines différentes ?	p.105
C. Régionalisation et expansion du TA	p.107

<b><i>Chapitre 2 : Etude de la réparation tissulaire du TA inguinal murin après ablation massive : le rôle des opioïdes</i></b>	p.108
<b>I. Introduction</b>	p.108



<b>A. Mise en place du modèle</b>	p.108
1. <i>Une « enveloppe conjonctive » apparaît sur le site de la lipectomie</i>	p.109
2. <i>Effet du régime gras sur la repousse du TA</i>	p.110
<b>B. Importance du système immunitaire</b>	p.111
1. <i>Importance du ganglion lymphatique</i>	p.111
2. <i>Lipectomie sur différentes souches de souris présentant des déficits / pathologies immunitaires</i>	p.111
3. <i>Etude comparée des souris C57BL/6 et MRL</i>	p.113
a) <i>Caractérisation de la phase inflammatoire</i>	p.113
b) <i>Apparition d'une fibrose chez la souris C57BL/6</i>	p.115
<b>II. Article 2</b>	p.116
<b>III. Résultats complémentaires</b>	p.144
<b>A. Régénération et opioïdes</b>	p.144
1. <i>Niveau d'expression des opioïdes endogènes au niveau tissulaire</i>	p.144
a) <i>Expression génique basale d'opioïdes endogènes chez les souris C57BL/6 et MRL</i>	p.144
b) <i>Expression génique d'opioïdes endogènes chez les souris C57BL/6 et MRL, après lipectomie</i>	p.145
2. <i>Quelles populations cellulaires du TA expriment PENK ?</i>	p.145
<b>B. Ucp1 et régénération</b>	p.146
<b>IV. Discussion</b>	p.147
A. <b>Fibrose, inflammation et régénération</b>	p.147
B. <b>Deux types de réparation tissulaire (cicatrisation / régénération) associés à deux tonsus d'opioïdes endogènes</b>	p.150
C. <b>Lien entre cellules immunitaires et opioïdes au cours de la réparation du TA</b>	p.153
D. <b>Régénération et inhibition de la voie Hippo</b>	p.154
E. <b>Ucp1 et opioïdes</b>	p.155
F. <b>Innervation, opioïdes et régénération</b>	p.156
G. <b>La régénération du TA : son intérêt en thérapeutique</b>	p.159

---

<b>ANNEXES</b>	p.161
----------------	-------

Article en soumission dans <i>Nature Communications</i> : Corrupted adipose tissue endogenous myelopoiesis 1 initiates diet-induced metabolic disease.	p.162
--	-------

Curriculum Vitae	p.183
------------------	-------

---

<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	p.185
----------------------	-------



# ABRÉVIATIONS

---





**A2COL6** : chaîne alpha 2 du collagène de type 6

**ACC** : Acétyl CoA Carboxylase

**ACTH** : adrénocorticotropine

**AG** : Acides Gras

**AGNE** : Acide Gras Non Estérifiés

**AMPc** : Adenosine MonoPhosphate cyclique

**aP2** : adipocyte binding Protein 2

**ARNm** : Acide Ribonucléique messenger

**ASC** : Adipose Stromal Cells

**ASICS** : Acid-Sensing Ion Channels

**ATP** : Adenosine TriPhosphate

**BMP** : Bone Morphogenic Protein

**C/EBP** : CCATT/ Enhancing Binding Protein

**CB1** : Récepteur aux endocannabinoïdes de type 1

**CCR5** : Récepteurs à C-C chimiokine de type 5

**CGRP** : Calcitonin Gene Related Protein

**Cidea** : Cell death Activator

**CSH** : Cellules souches hématopoïétiques

**CSM** : Cellules stromales mésenchymateuses

**CXCL2** : C-X-C motif chemokine 12

**DAMGO** : D-Ala<sup>2</sup>, N-Me-Phe<sup>4</sup>, Gly-ol-enkephalin

**DPDE** : [D-Pen<sup>2,5</sup>]Enképhaline

**EAO** : Espèces Actives de l'Oxygène

**EGF** : Epidermal Growth Factor

**ERK** : Extracellular signal- Regulated Kinase

**FAS** : Fatty Acid Synthase

**FGF21** : Fibroblast Growth Factor 21

**GDNG** : Glial Derived Neurotrophic Factor

**GDP** : Guanosine DiPhosphate

**GGF** : Glial Growth Factor

**GIRK** : G protein regulated inward rectifying K<sup>+</sup> channels

**GLUT** : Transporteur du glucose

**GPI** : Glycosyl Phosphatidyl Inositol

**GRK** : G protein coupled Receptors Kinase

**IFN- $\gamma$**  : Interferon-gamma

**Ig** : Immunoglobulines

**IL** : interleukine

**ILC2** : Innate Lymphocyte de type 2

**KLS** : c-Kit-, Lin-, Sca+

**LHS** : Lipase Hormono Sensible

**LMG** : Lipase MonoGlycéride

**M1** : Macrophages de type 1 ou pro-inflammatoire

**M2** : Macrophages de type 2 ou anti-inflammatoire

**MCP1** : Monocytes Chemoattractant Protein 1

**MEC** : Matrice ExtraCellulaire

**MMP** : Metalloprotéinases matricielles

**MRL** : Murphy Roths Large



**MSH** : Mélanocytes Stimulating Hormones

**NA** : Noradrénaline

**nAG** : newt Anterior Gradient

**NGF** : Neural Growth Factor)

**NK** : Neurokinine 1,

**NPY** : Neuropeptide Y

**Ob** : leptine

**PDGF** : Platelet Derived Growth Factor

**PDYN** : ProDYNorphine

**PENK** : ProENKéphaline

**PEPCK** : PhosphoEnolPyruvate Carboxylkinase

**PGC1- $\alpha$**  : Peroxisome Proliferator Peroxisome Proliferated Activated Receptor-gamma co-activator 1-alpha

**PKA** : Protein Kinase A

**POMC** : ProOpioMélanoCortine

**PPAR- $\gamma$**  : Peroxisome Proliferated Activated Receptor-gamma

**PRDM16** : Positive Regulatoy Domain Containing 16

**Pref-1** : Preadipocyte Factor 1

**RCPG** : Récepteurs Couplés aux Protéines G

**ROS** : Reactive Oxygen Species

**Shh** : Sonic Hedgehog

**S/REBP** : Sterol Regulatoy Binding Protein

**SST** : Récepteur à la somatostatine

**SVF** : Stromal Vascular Fraction

**TA** : Tissu Adipeux

**TASK** : TWIK1 Acid Sensitive K<sup>+</sup> Channels

**Tcf** : Transcriptor Factor 21

**TG** : TriGlycérides

**TGF- $\beta$**  : Tissue Growth Factor-beta

**TH** : Tyrosine Hydroxylase

**TIMP-1** : Tissue Inhinibtor of Metalloprotéinases 1

**TNF- $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor-alpha

**tPA** : Tissue Plasminogen Activator

**TRAAK** : TWIK1 Acid Arachidique Sensitive K<sup>+</sup> Channels

**TREK** : TWIK1 Related K<sup>+</sup> Channels

**TrkA** : Tropmyosin receptor Kinase A

**TRPM** : Transient Receptor Potential Mucolipin-8

**TRPV** : Transient receptor Vanilloid-1

**Ucp1** : UnCoupling Protein 1

**uPA** : Urokinase Plasminogen Activator

**VEGF** : Vascular Endothelium Growth Factor

**Wnt** : Wingless



TABLE DES

ILLUSTRATIONS

---



## **Table 1 : L'adipocyte et ses principales adipokines**

**Figure 1 :** Organe de stockage des lipides et évolution

**Figure 2 :** Différences entre les adipocytes brun et blanc

**Figure 3 :** Composition cellulaire du TA

**Figure 4 :** Stockage de lipides sous forme de TG au sein de l'adipocyte blanc

**Figure 5 :** La lipolyse : mobilisation des réserves lipidiques

**Figure 6 :** Ucp1 : protéine découplante mitochondriale

**Figure 7 :** Etapes de différenciation d'un adipocyte à partir d'un progéniteur

**Figure 8 :** Molécules et facteurs de transcription permettant la différenciation d'un précurseur en adipocyte mature

**Figure 9 :** Propriétés des cellules stromales du TA (ASCs)

**Figure 10 :** Origine des adipocytes blancs, beiges et bruns et leurs différents marqueurs de différenciation, chez la souris

**Figure 11 :** Tissu adipeux et moelle osseuse chez l'homme = corps gras chez la Drosophile

**Figure 12 :** Les différents noms des dépôts adipeux chez la souris et l'homme.

**Figure 13 :** Actions de la noradrénaline lors de la thermogénèse

**Figure 14 :** La régénération, réparation parfaite résultant d'un subtil équilibre de processus cellulaires et moléculaires

**Figure 15 :** La peau : organe complexe

**Figure 16 :** La cicatrisation cutanée

**Figure 17 :** L'hémostase

**Figure 18 :** Espèces réactives de l'oxygène et principales défenses anti-oxydantes enzymatiques

**Figure 19 :** Production d'espèces réactives de l'oxygène par la NADPH oxydase

**Figure 20 :** Recrutement des fibroblastes / fibrocytes dans la réparation tissulaire et le remodelage tissulaire

**Figure 21 :** Représentation schématique de l'activation de MMP-9

**Figure 22 :** Les cellules souches de la peau

**Figure 23 :** Les différents organismes dotés de la capacité à régénérer

**Figure 24 :** Formation de la blastema chez la salamandre.

**Figure 25 :** La blastema des différentes organismes capables de régénérer

**Figure 26 :** Différentes répartitions de production d'EOs en fonction des espèces.





**Figure 27** : Conséquences de la production d'EAOs après lésion chez différentes espèces qui régénèrent

**Figure 28** : Corrélation inverse entre complexité du système immunitaire et capacité à régénérer

**Figure 29** : Importance de la libération de nAG pour la régénération de la pâte chez la salamandre

**Figure 30** : Régénération de l'oreille de la souris MRL, en comparaison à la souris C57BL/6

**Figure 31** : Implication de l'innervation au cours des processus de régénération chez la MRL

**Figure 32** : Les différents canaux présents sur les nocicepteurs et leurs stimuli

**Figure 33** : Douleur inflammatoire

**Figure 34** : Voie neuro-anatomique de la nociception

**Figure 35** : La transduction du signal nociceptif

**Figure 36** : Les opioïdes endogènes et leurs peptides

**Figure 37** : Représentation schématique du système opioïde endogène

**Figure 38** : Activation et désensibilisation du récepteur aux opioïdes mu

**Figure 39** : Hypothèse de travail

**Figure 40** : Organisation des fibres nerveuses autonomes sympathiques du TA

**Figure 41** : Innervation du TA

**Figure 42** : Effet du régime gras sur l'organisation du TA inguinal

**Figure 43** : Augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire et lipogenèse dans la NSLA après mise sous régime gras

**Figure 44** : Absence de variation de l'expression de gènes adipogéniques dans la SLA, après mise sous régime gras

**Figure 45** : Le régime gras entraîne une diminution de l'expression des gènes impliqués dans le brunissement uniquement dans la SLA

**Figure 46** : Effet de l'âge sur l'organisation du TA inguinal

**Figure 47** : Repères anatomiques pour la réalisation de lipectomie

**Figure 48** : Mise en place du modèle de lipectomie

**Figure 49** : Evolution du poids du TA lipectomié en fonction des deux types de lipectomie partielle

**Figure 50** : Le rapport masse grasse / masse maigre n'est pas modifié, 2 mois après la lipectomie partielle à l'aîne



**Figure 51** : Mise en place d'une enveloppe conjonctive à différents temps après la lipectomie

**Figure 52** : Evolution du TA chez la C57BL/6 après lipectomie partielle

**Figure 53** : Le régime gras améliore la récupération du poids du TA lipectomié

**Figure 54** : Comparaison entre les lipectomies aine (LP) et lipectomies aine avec ablation du ganglion (LPG)

**Figure 55** : Seule la souche de souris MRL régénère son TA, 2 mois après lipectomie

**Figure 56** : Régénération du TA chez la souris MRL

**Figure 57** : 2 semaines après la lipectomie, le front de lésion présente une organisation particulière chez la souris MRL

**Figure 58** : 2 mois après lipectomie, régénération du TA chez la souris MRL

**Figure 59** : Comparaison de la réponse inflammatoire 24h après la lipectomie chez les souris MRL et C57BL/6

**Figure 60** : Mise en place d'une fibrose chez la souris C57BL/6

**Figure 61** : Expression de différents marqueurs impliqués dans le remodelage tissulaire et dans la transition épithélio-mésenchymateuse à différents temps après la lipectomie chez les souris MRL et C57BL/6

**Figure 62** : Expression de PENK en condition basale ou après la lipectomie dans les ASCs et TA

**Figure 63** : Diminution de l'expression génique d'UCP-1, 2 semaines après la lipectomie chez les souris C57BL/6

**Figure 64** : Les souris UCP-1 KO régénèrent aussi bien que les souris C57BL/6 sauvages traitées à la naloxone méthiodide









**Figure 65** : Schéma récapitulatif : pourquoi les souris C57BL/6 ne régénèrent pas?

**Figure 66** : Schéma récapitulatif : pourquoi les souris MRL et C57BL/6 traitées avec un antagoniste des récepteurs aux opioïdes régénèrent?



# INTRODUCTION

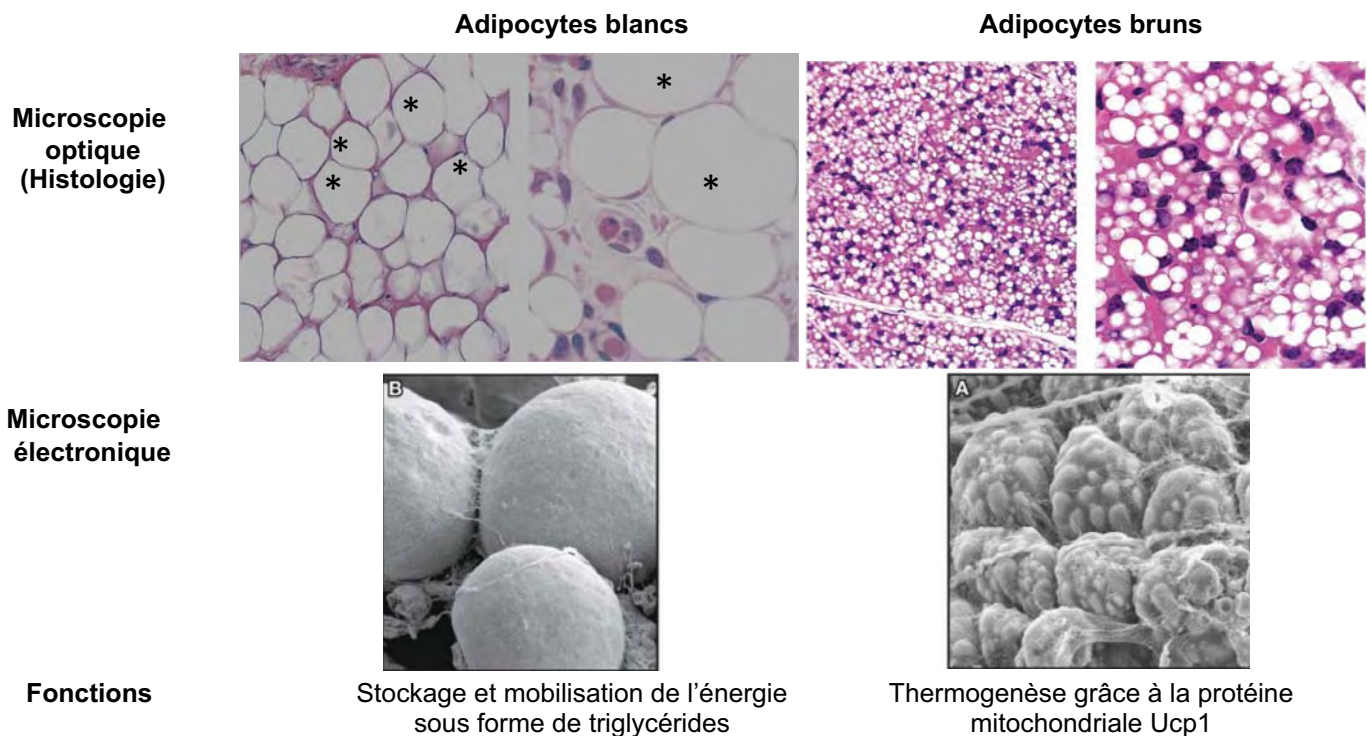
---

Species	 <i>Caenorhabditis elegans</i>	 <i>Drosophila melanogaster</i>	 <i>Carcharodon carcharias</i>	 <i>Cyprinus carpio</i>	 <i>Xenopus laevis</i>	 <i>Gallus gallus domesticus</i>	 <i>Mus musculus</i>	 <i>Homo sapiens</i>
Stockage des lipides	Cellule intestinale	Corps gras	Foie	TA blanc	TA blanc	TA blanc sc et profond	TA blanc sc et profond	TA blanc sc et profond
Sécrétion de leptine	NON			OUI				
TA brun	ABSENCE						Toute la vie	Naissance puis réduit chez l'adulte

**Figure 1 : Organe de stockage des lipides et évolution**

La distribution des tissus adipeux (TA) et le stockage des lipides a beaucoup changé au cours de l'évolution. Chez le ver *C. elegans*, le stockage des lipides se fait dans l'intestin alors que la drosophile *Drosophila melanogaster* un corps gras. Le requin *Carcharodon carcharias*, lui, est dépourvu de TA et utilise son foie pour le stockage lipidique. On note que l'apparition de la leptine est concomitante avec l'apparition d'un « vrai » TA chez les poissons *Cyprinus carpio*. La séparation des TA sous-cutané (sc) et profond apparaît dans les espèces plus évoluées telles que les oiseaux (*Gallus gallus domesticus*) et les mammifères (*Mus musculus*, *homo sapiens*).

Adapté de Hotamisligil, 2006



**Figure 2 : Différences entre les adipocytes brun et blanc**

Image par microscopie électronique d'adipocytes blancs, cellules de grande taille (100 à 200 µm de diamètre) présentant une seule et unique gouttelette lipidique (\*) à la différence des adipocytes bruns, de petite taille (15 à 60 µm de diamètre) présentant de multiples et petites gouttelettes lipidiques.

Adapté de Cinti, 2012

# **Chapitre I :**

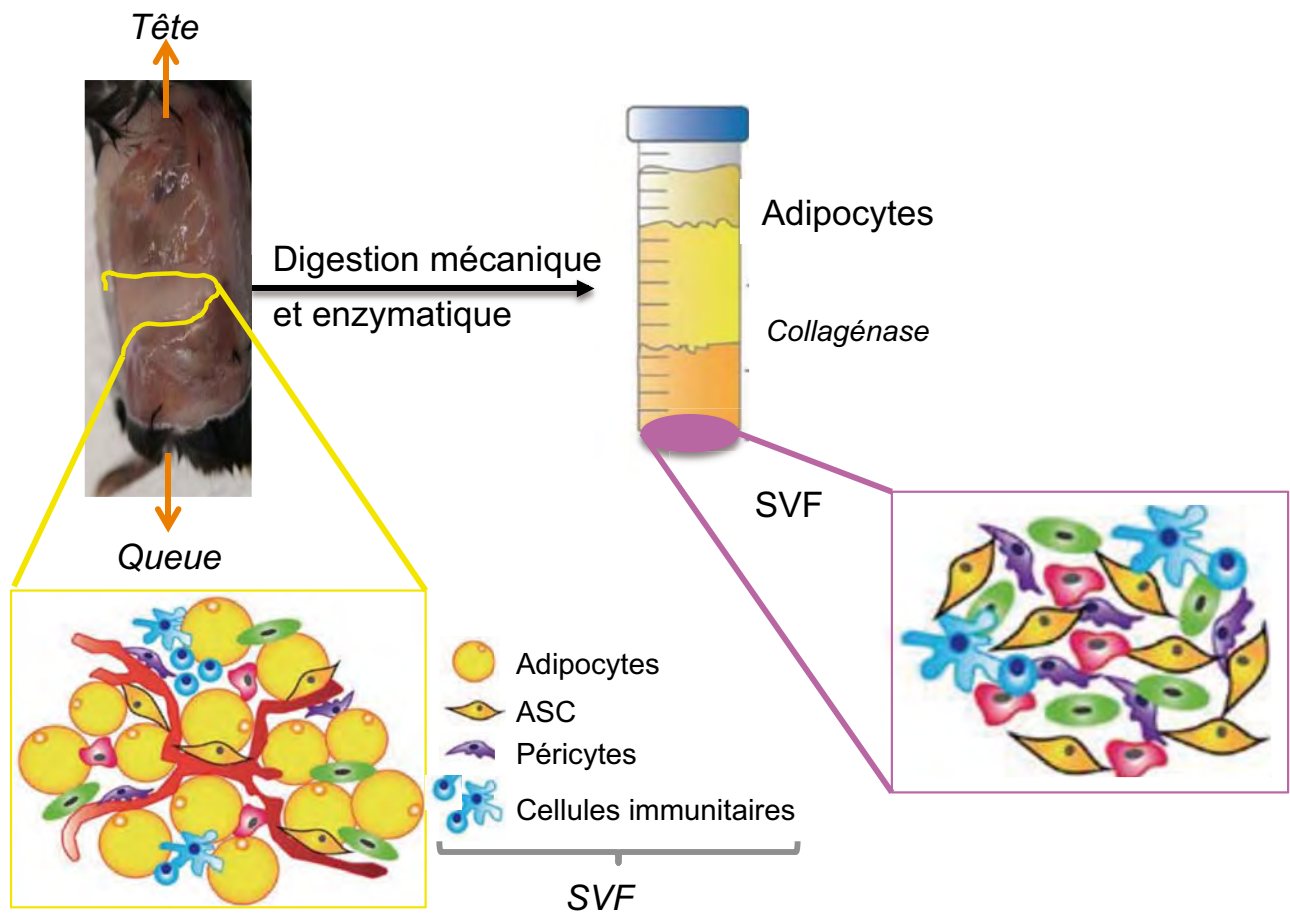
## **De la fonctionnalité à l'organisation**

### **des tissus adipeux**

Etymologiquement, adipeux vient du latin « adeps » qui signifie « graisse ». Le tissu adipeux (TA) est donc un tissu capable de stocker « les graisses », c'est-à-dire les lipides. D'un point de vue évolutif, ce tissu apparaît chez les poissons osseux (*Fig. 1*) et est largement conservé au cours de l'évolution. Chez les mammifères, ce tissu se présente sous la forme de plusieurs dépôts avec des localisations anatomiquement multiples. Chez l'adulte en bonne santé, la masse de l'ensemble des TA représente 15 à 20% de la masse totale de l'organisme et reste constante au cours de la vie, même si la distribution entre les dépôts peut varier, notamment avec l'âge.

#### **I. Les tissus adipeux : généralités**

On distingue classiquement deux types de TA : le TA blanc et le TA brun. Ces deux tissus diffèrent selon leur fonction : i) le TA blanc est impliqué dans le stockage et la mobilisation de réserves lipidiques alors que ii) le TA brun est spécialisé dans la dissipation d'énergie sous forme de chaleur au cours de la thermogenèse. Si ces deux tissus possèdent des similitudes (constitués principalement d'adipocytes, fortement vascularisés et innervés, encapsulés d'un tissu conjonctif<sup>1</sup>), ils se distinguent par la morphologie et le fonctionnement de leurs adipocytes (principales cellules assurant la fonction du TA) (*Fig. 2*). On distingue ainsi : i) les adipocytes blancs, cellules de grand diamètre dotées d'une grande et unique vacuole lipidique et ii) les adipocytes bruns, cellules de petit diamètre, qui possèdent plusieurs gouttelettes lipidiques ainsi qu'un plus grand nombre de mitochondries et exprimant une protéine mitochondriale spécifique, la protéine découplante 1 ou Ucp1. Ces deux cellules définissent donc le TA blanc et le TA brun, même si nous le verrons



**Figure 3 : Composition cellulaire du TA**

La digestion mécanique et enzymatique du TA inguinal de souris permet de récupérer les adipocytes (qui se retrouvent en suspension) et les cellules de la SVF (Stromal Vascular Fraction) (qui se localisent au niveau du culot).



par la suite, la distinction TA blanc / TA brun n'est pas aussi franche (TA beige). Ces deux dépôts (blanc et brun) aux organisations différentes sont également caractérisés par une localisation différente.

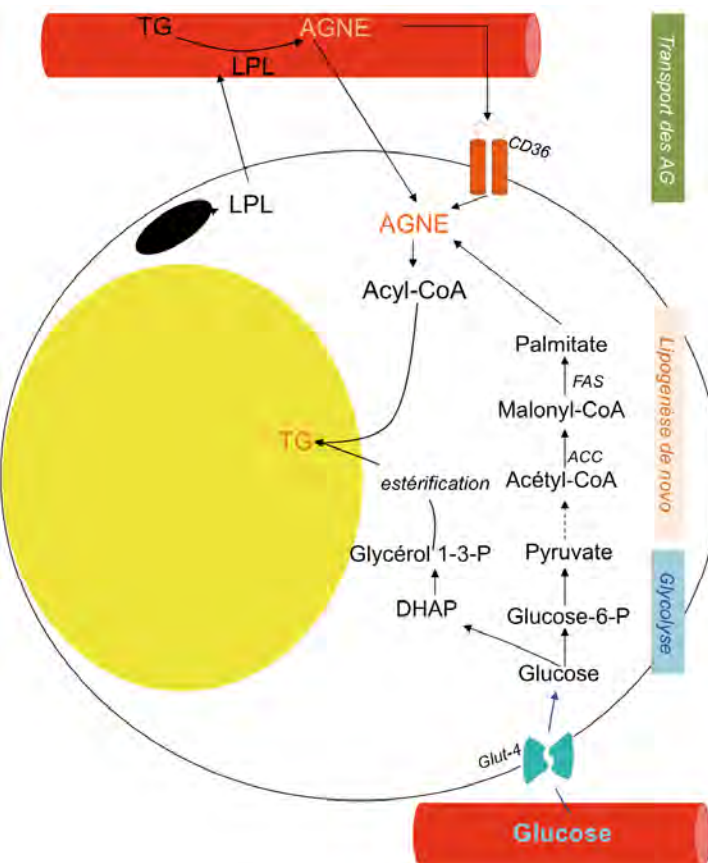
### **A. Le TA blanc**

Le TA blanc, présent chez tous les mammifères, est le lieu de stockage de l'énergie par excellence. Il est aussi considéré depuis les années 90s comme un tissu endocrine pouvant participer à la régulation de toutes les grandes fonctions physiologiques. Ce TA est constitué d'adipocytes blancs. Ces cellules peuvent mesurer, à l'état mature, entre 100 et 200  $\mu\text{m}$  de diamètre chez l'homme et stockent les triglycérides (TG) au niveau d'une grosse et unique vacuole lipidique qui repousse le noyau et le cytoplasme en périphérie (*Fig. 2*). Le TA blanc est sous-divisé en TA sous-cutané et TA profond (ou viscéral) (*cf Chapitre 1, paragraphe III.*). A côté de ces dépôts adipeux de TA blancs « classiques », on retrouve des adipocytes blancs dans la moelle osseuse et de manière sporadique dans certains tissus (muscles).

### **B. Le TA brun**

Le TA brun est un tissu spécialisé dans la production de chaleur ; ce tissu est spécifique des mammifères placentaires (*Fig.1*). Il est quantitativement important chez les hibernants, les nouveau-nés et chez certaines espèces lors de l'acclimatation au froid (chien, rat, chat, lapin). Sa couleur brune est due à une abondante irrigation sanguine et à une grande richesse des adipocytes en mitochondries. Contrairement au TA blanc, le TA brun possède une machinerie moléculaire qui lui permet de consommer ses propres réserves de triglycérides après hydrolyse. Le TA brun est présent à différents endroits, que nous verrons dans le paragraphe III (*cf Chapitre 1, paragraphe III, A*).

*Alors que l'organisation et le développement des TA ne sont pas très étudiés, les études portant sur les différentes populations cellulaires composant les TA sont nombreuses, puisque ces dernières sont largement impliquées dans la mise en place des pathologies métaboliques (TA blanc) et dans la réponse au froid (TA brun).*



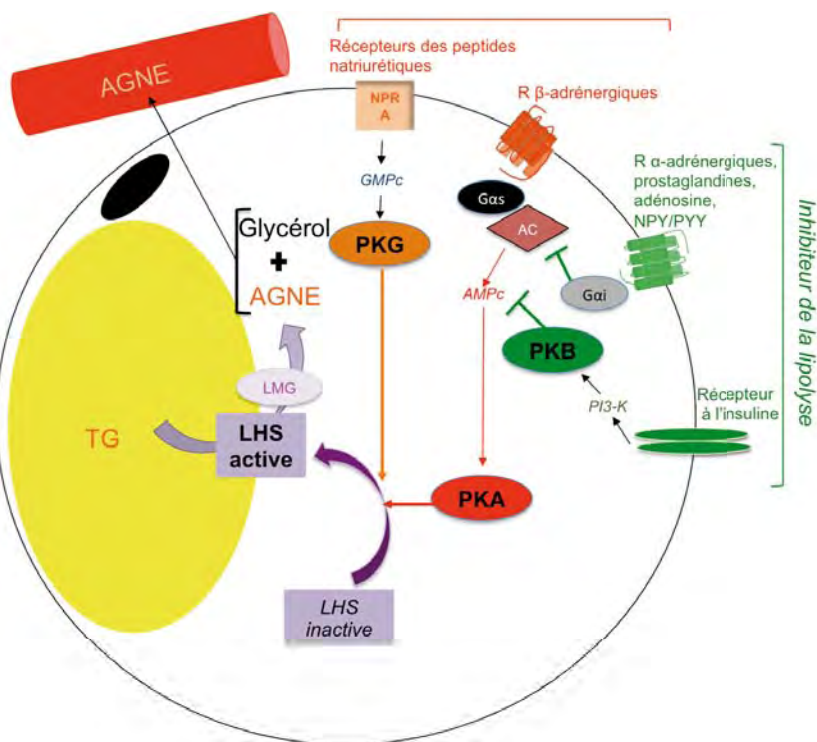
**Figure 4 : Stockage de lipides sous forme de TG au sein de l'adipocyte blanc**

Captation des AGNE : en période post prandiale, les TG circulent sous forme de chylomicrons ou LDL. L'adipocyte synthétise et sécrète la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme qui se relocalise à la membrane des cellules endothéliales. La LPL permet l'hydrolyse des TG circulants en AG qui sont captés par les adipocytes par diffusion passive ou par les transporteurs de la famille des FATP (Fatty Acid Transport Protein) ou CD36. Le glucose, qui entre par les transporteurs Glut-1 (expression ubiquitaire) et Glut-4 (expression dans les tissus insulino-sensibles; l'insuline permettant une translocation de Glut-4 à la membrane, donnera soit du glycérol, soit des AGNE. C'est la lipogénèse de novo.

Pour la lipogénèse de novo, après entrée dans l'adipocyte, le glucose est métabolisé en pyruvate. Ce dernier est transformé en acétyl-coA puis en malonyl-coA par la fatty acid synthase (FAS), qui lui ajoute des molécules d'acyl-coA, donnant ainsi des acides gras de longueur variable

ACC : Acétyl Coenzyme A (CoA) Carboxylase, AGNE : Acide Gras Non Estérifié, DHAP : DiHydroxyAcétone Phosphate; FAS : Fatty Acid Synthase; GLUT : GLUcose Transporter; LPL : LipoProtreine Lipase; TG : TriGlycérides.

Adapté de Féve B, 2003



**Figure 5 : La lipolyse : mobilisation des réserves lipidiques**

Les récepteurs β-adrénergiques sont couplés positivement à l'adenylate cyclase (AC) via une protéine  $G_{\alpha s}$ . L'activation de l'AC entraîne une production d'AMPc qui active la PKA (protéine Kinase A) qui stimule la phosphorylation de la LHS (Lipase Hormono-Sensible). L'activation des récepteurs aux peptides natriurétiques entraînent une augmentation de GMPc. Ce dernier active la Protéine Kinase G (PKG) qui active la LHS, toujours par phosphorylation.

Les récepteurs α-adrénergiques (tout comme les récepteurs au neuropeptide Y (NPY), aux prostaglandines et l'adénosine) sont couplés à une protéine  $G_{\alpha i}$  et bloquent la production d'AMPc. L'activation de ces récepteurs a donc un effet anti-lipolytique, comme l'activation des récepteurs à l'insuline. L'activation de ces derniers entraîne l'activation de la PI3-K (PI3-Kinase) qui active la voie PKB/AKT entraînant l'activation de la voie phosphodiesterase 3B qui hydrolyse l'AMPc.

**Vert** : inhibition de la lipolyse

**Rouge** : activation de la lipolyse

## **II. Les cellules du TA**

Le TA présente une grande hétérogénéité cellulaire (*Fig. 3*). En effet, après digestion mécanique et enzymatique du TA, deux populations cellulaires sont séparées après centrifugation : i) les adipocytes qui représentent environ 50% du nombre total de cellules du TA blanc (que l'on retrouve dans le surnageant) et ii) les cellules de la fraction stromavasculaire ou SVF <sup>2,3</sup> (que l'on retrouve au niveau du culot après centrifugation). Cette dernière est hétérogène et composée de i) 30 à 40% de progéniteurs adipocytaires aussi appelés ASC (Adipose Stromal Cells), ii) 40 à 50% de cellules immunitaires, iii) 5 à 10 % de cellules endothéliales.

### **A. Les adipocytes**

#### *1. Les adipocytes blancs*

L'adipocyte blanc assure à la fois une fonction métabolique (réserves énergétiques sous forme de triglycérides (TG) et une fonction sécrétoire/endocrine.

#### a) Stockage et mobilisation des réserves énergétiques sous forme lipidique

En situation de balance énergétique excédentaire (période post-prandiale par exemple), les adipocytes blancs stockent des TG au niveau de leur vacuole lipidique, à partir d'acides gras (AG) provenant de la circulation sanguine et/ou issus de la lipogenèse *de novo* à partir de glucose <sup>4</sup> (*Fig. 4*). Ces AG libres sont activés en acyl-CoA, par les acyl-CoA synthétases, avant d'être estérifiés de manière séquentielle, à une molécule de glycérol (*Fig. 4*).

Inversement, en période de déficit énergétique, les adipocytes blancs libèrent de l'énergie sous forme d'AG libres et de glycérol grâce à la lipolyse. La lipolyse est possible par l'activation successive de l'ATGL, de la lipase hormono-sensible (LHS) et de la lipase des monoglycérides (LMG). Le contrôle de la lipolyse se fait essentiellement par la régulation de l'activité de la LHS qui est, entre autre, dépendante d'une phosphorylation réversible par une kinase dépendante de l'AMPc (PKA), activée par différents récepteurs membranaires (*Fig. 5*). La lipolyse est également fortement contrôlée par l'innervation autonome sympathique du TA, comme nous le verrons plus tard.

Adipokines	Sources	Cellules cibles	Fonctions
Leptine	Principalement adipocytaire	Cerveau Adipocytes Ostéoblastes Ovaires	Diminue l'appétit via le système nerveux central Stimule la lipolyse et inhibe la lipogenèse Stimule la différenciation des ostéoblastes Maturation des gamètes
Adiponectine		Adipocytes Cellules immunitaires Cellules musculaires Hépatocytes	Sensibilisation à l'insuline Anti-inflammatoire Sensibilisation à l'insuline Sensibilisation à l'insuline
Adipsine		Adipocytes	Stimule le stockage des TG et inhibe la lipolyse
PAI-1		Cellules endothéliales Adipocytes	Inhibe la synthèse de tPA et uPA Favorise l'insulino résistance
Apeline		Cellules endothéliales Cellules musculaires Hypothalamus Cœur, poumon, ...	Favorise l'angiogenèse, vasodilatateur Stimule le métabolisme glucidique Régulation prise hydrique (Augmentation diurèse)
SFRP5		Cellules immunitaires	Inhibition de la signalisation WNT pro-inflammatoire
Résistine	Cellules mononuclées	Adipocytes Macrophages	Implication dans la résistance à l'insuline; stimule la sécrétion d'IL-6 et TNF- $\alpha$
TNF- $\alpha$	Cellules de la SVF	Macrophages, lymphocytes Adipocytes	Pro-Inflammatoire  Insulino-résistance
CCL2 / MCP1	Cellules de la SVF	Monocytes Adipocytes	Recrutements des monocytes Augmente la lipolyse et sécrétion d'insuline
IL-6	Cellules de la SVF, foie, muscle	Cellules immunitaires  Adipocytes	Différentes fonctions en fonction des tissus mais généralement pro-inflammatoire Insulino-résistance
CCL2 / MCP1	Cellules de la SVF	Monocytes Adipocytes	Recrutements des monocytes Augmente la lipolyse et sécrétion d'insuline
TGF- $\beta$	Principalement macrophagique	Macrophages Fibroblastes	Anti-inflammatoire Différenciation en myofibroblastes
Lipocaline 2		Adipocytes	Favorise la sécrétion de TNF- $\alpha$ par les adipocytes et favorise l'insulino-résistance
NAMPT		Monocytes	Activité de chimotactisme pour les monocytes
ANGPTL2	Autres cellules	Cellules immunitaires et endothéliales	Inflammation locale et vasculaire

**Table1 : L'adipocyte et ses principales adipokines**

ANGPTL2 : angiopoïétine-like protein 2; CCL2 : CC-chemokine ligand-2; IL-6 : interleukine 6; NAMPT : Nicotinamide phosphoribosyltransferase; SFRP5 : secreted Frizzled Relative protein 5; TNF- $\alpha$  : Tumour necrosis factor  $\alpha$ ; PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor 1; TGF- $\beta$  : transforming growth Factor  $\beta$  ,

*Adapté d' Ouchi, 2011*

## b) Fonction sécrétoire

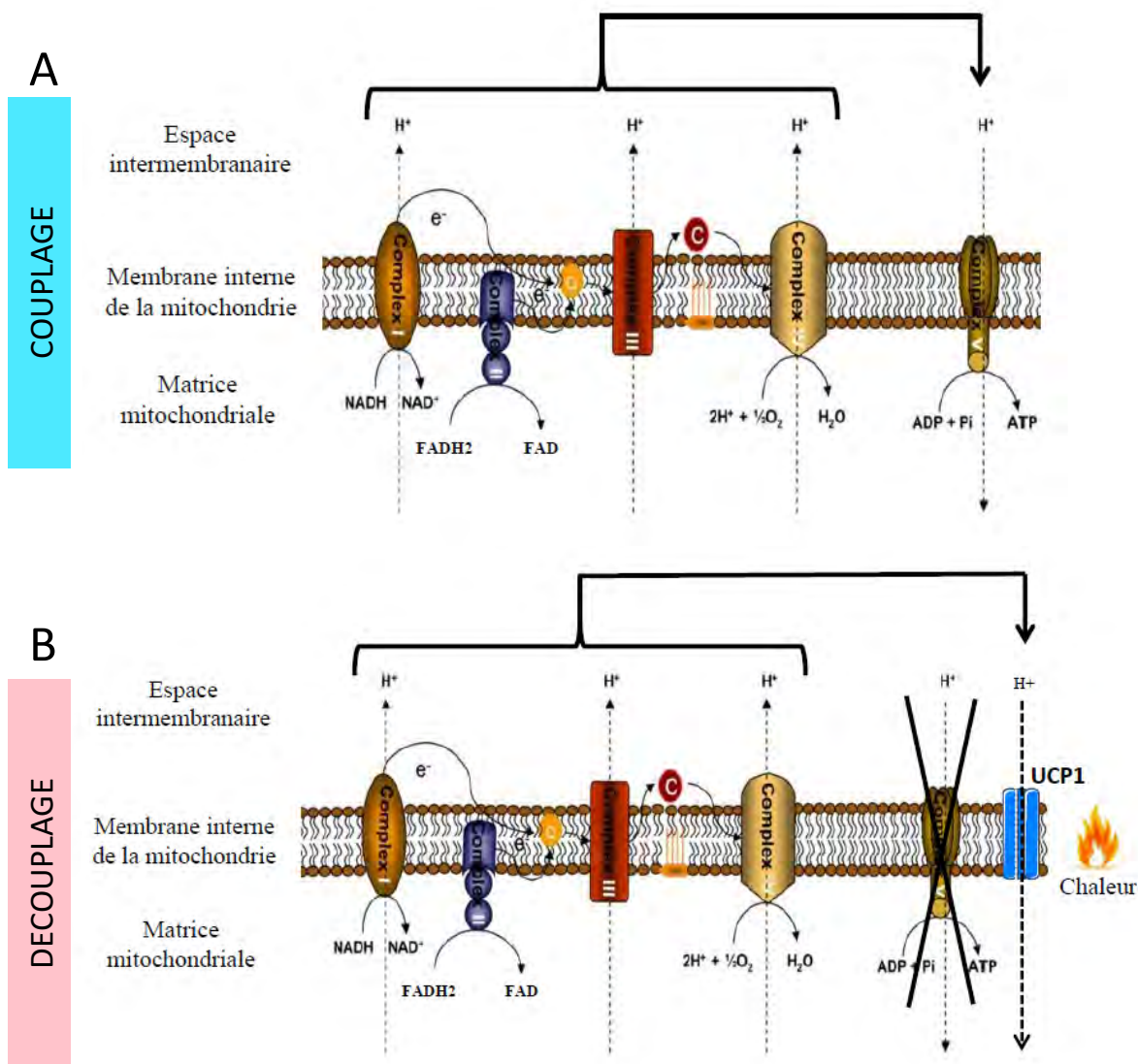
Depuis la découverte de la leptine <sup>5</sup> en 1994 par Zhang et coll, les adipocytes blancs sont considérés comme de véritables cellules endocrines capables de sécréter une multitude de molécules dénommées « adipokines » (*Table 1*). Ces adipokines sont capables d'agir localement (au niveau du TA blanc) ou à distance (sur d'autres organes, telle une hormone). A l'origine, on nommait « adipokines », les molécules sécrétées exclusivement par les adipocytes blancs (leptine, adiponectine, ...). Aujourd'hui, on nomme « adipokines », l'ensemble des molécules libérées par le TA (IL-6, VEGF,...), et ne sont donc plus spécifiques de l'adipocyte.

A titre d'exemple, la leptine est une hormone aux effets pléiotropes. Elle est synthétisée et sécrétée proportionnellement au stock de TG dans le TA. Sa libération dans le sang permet, au niveau cérébral, l'activation, des réseaux neuronaux anorexigènes et l'inhibition des réseaux orexigènes. La leptine augmente également les dépenses énergétiques par l'activation des voies efférentes sympathiques. La mutation du gène pour la leptine qui caractérise les souris *ob/ob*, entraîne ainsi une obésité et un syndrome métabolique associé<sup>6,5</sup>. La leptine joue également un rôle sur les organes reproducteurs (activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire, et maturation des follicules ovariens) <sup>7</sup>, sur le système immunitaire (effet anti-inflammatoire)<sup>8</sup> et sur le métabolisme osseux (activation de la prolifération des ostéoblastes et inhibition de la différenciation des ostéoclastes)<sup>9</sup>.

La découverte récurrente de nouvelles adipokines qui mettent en interaction TA et toutes les grandes fonctions de l'organisme conforte un rôle pivot de ce TA blanc dans le maintien de l'homéostasie en général<sup>10</sup>.

## 2. *Les adipocytes bruns*

L'adipocyte brun est une cellule de plus petite taille (15 à 60  $\mu\text{m}$  de diamètre) possédant plusieurs gouttelettes lipidiques et un grand nombre de mitochondries dotées de crêtes laminaires développées (révélateur de la grande activité respiratoire de ces cellules) et pourvues d'une grande quantité de protéine Ucp1 (UnCoupling Protein 1). Cette protéine permet la thermogénèse en découplant le fonctionnement de la chaîne respiratoire de celui de l'ATP synthase<sup>11,12</sup>. Ucp1, protéine insérée dans la membrane interne des mitochondries, agit comme un canal à protons qui permet leur retour massif dans la matrice mitochondriale et ainsi une



**Figure 6 : Ucp1 : protéine découplante mitochondriale**

A. Le transfert des électrons d'un complexe à l'autre de la chaîne respiratoire (CI,II,III, IV) est associé à l'expulsion de protons dans l'espace inter-membranaire. L'accepteur final de ces électrons est l'oxygène qui donnera alors des molécules d'eau. La membrane interne étant très peu perméable aux protons, ceux-ci s'accumulent dans l'espace intermembranaire et engendrent un gradient électrochimique qui sera utilisé par l'ATP synthase pour transformer cette énergie en molécule d'ATP : la consommation d'oxygène (c'est à dire la réduction au niveau du complexe IV) est couplée à la production d'ATP.

B. Dans les adipocytes bruns, Ucp1 s'insère dans la membrane interne et agit comme un canal à protons qui dissipe le gradient électrochimique dû au fonctionnement de la chaîne respiratoire sans permettre la synthèse d'ATP. Cette dissipation entraîne un « appel » d'équivalents réduits sur les complexes I et II et donc un plus grand nombre de cycle de Krebs et  $\beta$ -oxydation. L'accélération de ces réactions biochimiques exothermiques permet la production de chaleur.

*D'après la thèse de Yannick JEANSON, STROMALab, juin 2015*

augmentation des phosphorylations oxydatives. L'énergie issue de l'oxydation des substrats est ainsi dissipée sous forme de chaleur (*Fig. 6*). On comprend donc aisément qu'Ucp1 constitue une protéine cible pour augmenter la thermogenèse et donc les dépenses énergétiques et ainsi, lutter contre l'obésité et les surcharges métaboliques.

Comme pour l'adipocyte blanc, il est à noter que l'adipocyte brun libère des molécules à caractère endocrine et régulant l'activité des tissus impliqués dans l'homéostasie métabolique. Par exemple, la sécrétion de FGF21 par l'adipocyte brun après activation de la thermogenèse pourrait agir sur le TA blanc, le foie ou le pancréas <sup>13</sup>. L'adipocyte brun sécrète également du VEGF (facteur angiogénique), l'hormone thyroïdienne T3 ou la leptine <sup>14</sup>.

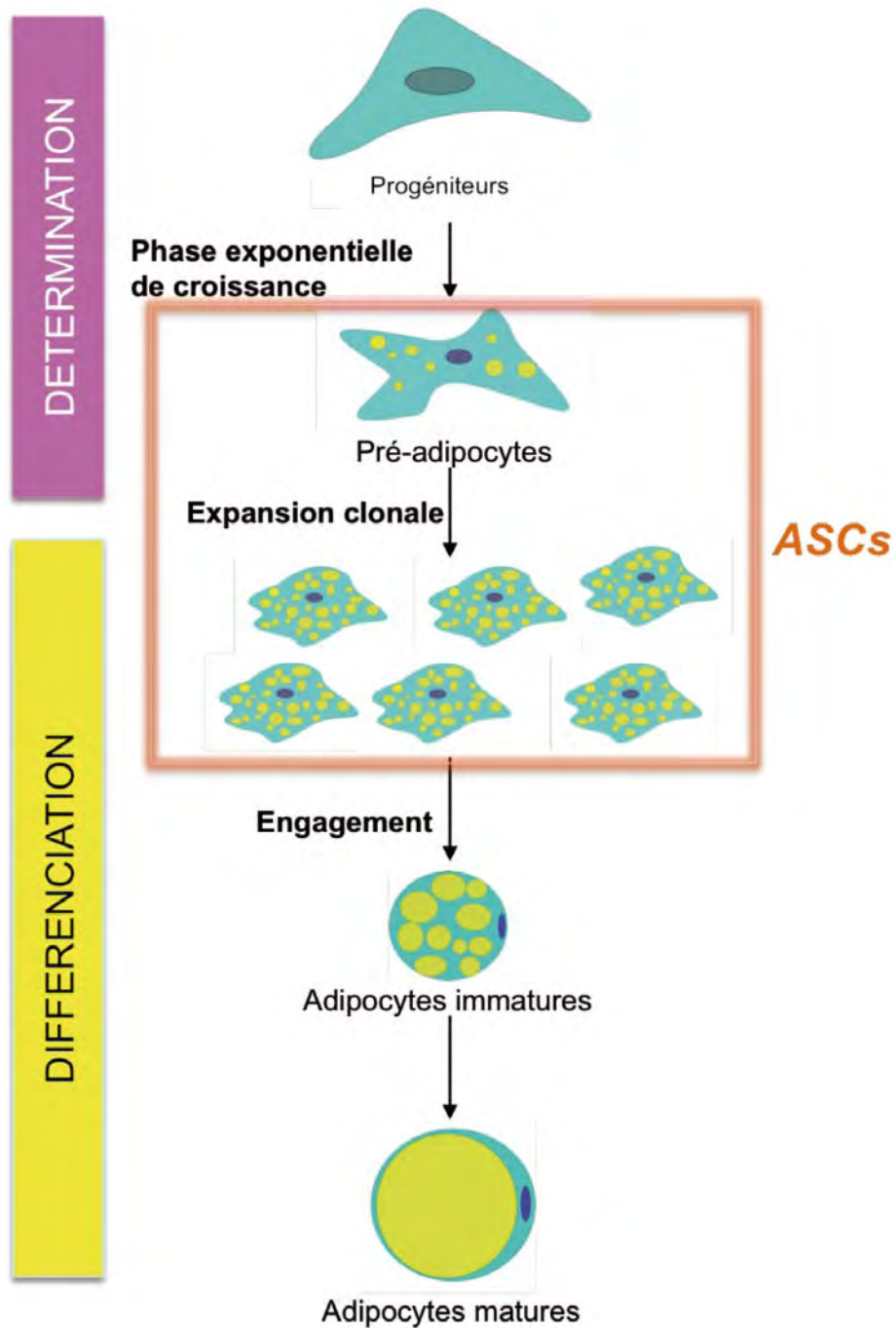
### *3. L'adipocyte beige : chimère entre l'adipocyte blanc et l'adipocyte brun*

L'adipocyte beige est une cellule très étudiée actuellement puisqu'on recense, depuis 1980, 5688 études relatives au terme « browning » au sein de la base de données bibliographiques PubMed. On a longtemps pensé qu'il existait seulement deux types d'adipocytes : l'adipocyte blanc et l'adipocyte brun, présents au sein de leurs dépôts respectifs et distincts. Néanmoins, dès les années 80s, certaines études mettent en évidence que des adipocytes avec des caractéristiques de type « bruns » (Ucp1 positifs, multiloculaires, grand nombre de mitochondries) peuvent émerger dans les dépôts adipeux classiquement appelés blancs, après une stimulation par le froid <sup>15,16</sup> ou par un agoniste des récepteurs  $\beta$ 3-adrénergiques <sup>17,18</sup>. Ces adipocytes multiloculaires exprimant Ucp1, après stimulation  $\beta$ -adrénergique ou stimulation au froid, dans le TA blanc seraient des adipocytes bruns « inductibles ». On les appelle adipocytes beiges ou brite (pour BRown In whiTE). L'apparition de telles cellules est appelée brunissement (« browning » en anglais) et est réversible <sup>19</sup>.

## **B. Les progéniteurs adipocytaires**

Depuis une dizaine d'années, on sait que les adipocytes (blancs) présentent un renouvellement d'environ 5 à 10% par an <sup>20</sup>. Les adipocytes matures étant incapables de se diviser, ce renouvellement est possible grâce à la présence de progéniteurs dans le tissu. L'adipogenèse (apparition de nouveaux adipocytes) est



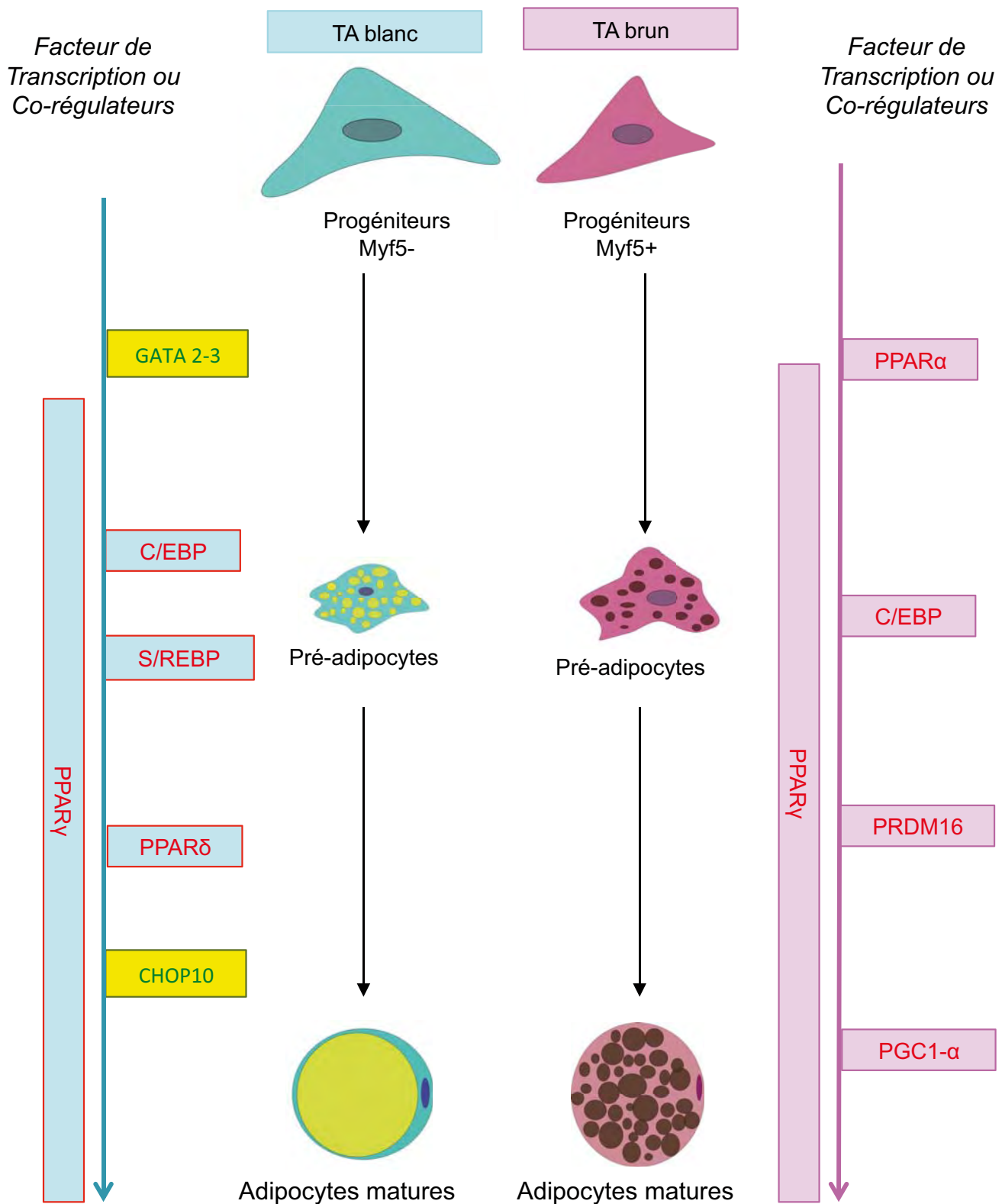


**Figure 7 : Etapes de différenciation d'un adipocyte à partir d'un progéniteur**

On appelle ASCs, l'ensemble des progéniteurs (plus ou moins différenciés)

*Adapté de Ailhaud 1992 et Grégoire 1998*



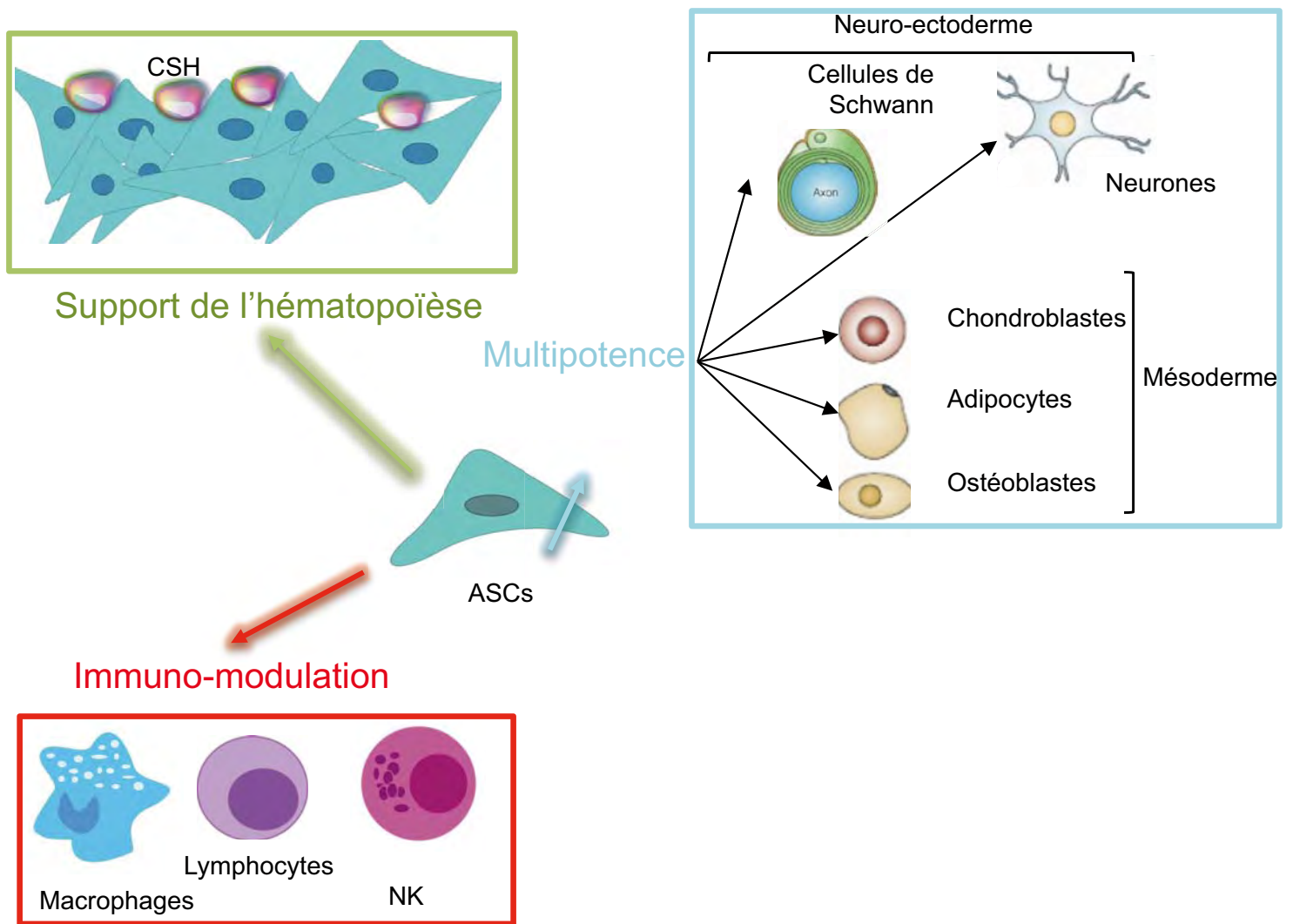


**Figure 8 : Molécules et facteurs de transcription permettant la différenciation d'un précurseur en adipocyte mature**

**En écriture verte :** les facteurs inhibant la différenciation.

**En écriture rouge :** les facteurs activant la différenciation.

CHOP : C/EBP homologous protein ; C/EBPs : CCAAT/enhancer binding proteins ; PPAR : peroxysome proliferator activated receptor; BMP : Bone Morphogenetic Protein; PRDM16 : Positive Regulatory Domain containing 16



**Figure 9: Propriétés des cellules stromales du TA (ASCs)**

- **La multipotence** : les ASCs (Adipose Stromal Cells), comme leur homologue de la moelle osseuse, les CSMs (Mesenchymal Stromal Cells) proviennent principalement du feuillet mésodermique ce qui explique qu'elles puissent se différencier en chondroblastes, adipocytes et ostéoblastes. Une origine neuro-ectodermique, pour certaines, leur permettrait de se différencier en neurones ou cellules gliales (Schwann).
- **L'immuno-modulation** : les ASCs diminuent l'infiltration des monocytes et inhibent la prolifération des Lymphocytes T ou NK
- **Support de l'hématopoïèse** des cellules souches hématopoïétiques des cellules souches hématopoïétiques (CSH)

classiquement décrite comme un processus à deux étapes : la détermination adipocytaire et la différenciation terminale. La première étape correspond à l'orientation d'une cellule progénitrice d'origine mésenchymateuse vers la lignée adipocytaire (*Fig. 7*). Par la suite, l'étape de différenciation adipocytaire nécessite l'existence d'un progéniteur adipocytaire et correspond au passage du préadipocyte (cellule déjà engagée avec de multiples petites gouttelettes lipidiques) à l'adipocyte (cellule mature possédant une unique et grosse vacuole lipidique). Au cours de ces processus, il est possible de décrire plusieurs étapes i) arrêt de la croissance, ii) expansion clonale, iii) différenciation précoce (multiples gouttelettes lipidiques) et iv) différenciation tardive (grosse gouttelette lipidique)<sup>21,22</sup> (*Fig. 7*).

### *1. Les progéniteurs adipocytaires blancs : renouvellement tissulaire et perspectives en médecine régénérative*

Pour les adipocytes blancs, les deux étapes (détermination et différenciation) sont orchestrées par différents l'activation des voies de signalisation des BMP4 (Bone Morphogenic Protein 4) ou de la voie Wnt mais aussi par facteurs de transcription dont les principaux sont : PPAR $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma), S/REBP ainsi que les membres de la famille des C/EBPs (CCAAT/Enhancer-Binding Protein)<sup>23</sup>. Il existe également des inhibiteurs de la différenciation comme GATA2 (*Fig. 8*).

L'ensemble des cellules dites « progéniteurs adipocytaires » est également appelé ASCs (pour Adipose derived Stem/Stromal Cells). En effet, les progéniteurs adipeux sont en fait multipotents et peuvent agir comme des cellules stromales, cellules qui supportent le fonctionnement d'autres cellules (adipocytes ici). Les cellules stromales les plus connues sont les cellules souches /stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse (CSMs). Comme pour les CSMs, les caractéristiques des ASCs sont les suivantes : i) multipotence, ii) support de l'hématopoïèse, et iii) propriétés immuno-modulatrices<sup>24,25</sup> (*Fig. 9*). On ne peut cependant pas parler de cellules souches puisqu'aucune étude n'a encore montré que les ASCs étaient capables de s'auto-renouveler<sup>26</sup>. En raison i) de leurs propriétés de cellules souches/stromales mésenchymateuses, ii) de la grande quantité de TA blanc (5 à 60% du poids corporel), iii) du grand nombre d'ASCs au sein du TA blanc et iv) de la facilité d'accès à ces cellules (au moins au niveau des TA blancs sous-cutanés), les ASCs constituent un candidat de choix en médecine régénérative. Elles sont



désormais utilisées dans un nombre croissant d'essais cliniques dont certains mis en place par le laboratoire (ischémie des membres, maladie de Crohn, reconstruction du maxillaire... <https://clinicaltrials.gov/> <sup>27</sup>) même si leurs mécanismes d'action ne sont pas encore définitivement établis. L'effet bénéfique de l'utilisation des ASCs en thérapie cellulaire passe en partie par leur capacité d'immunomodulation <sup>28</sup>. Généralement, les ASCs sont triées par le phénotype CD45<sup>-</sup> (CD : Cluster de différenciation), CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, Sca1<sup>+</sup> <sup>2</sup>. Cependant, lorsqu'on isole ces cellules, il convient de savoir qu'on est en présence d'un ensemble hétérogène de cellules stromales plus ou moins engagées dans la différenciation.

Selon la localisation du dépôt, l'origine embryonnaire des progéniteurs adipocytaires est double : mésodermique (comme les CSMs) et neuro-ectodermique pour les TA de la face <sup>29</sup> (*Fig. 9*).

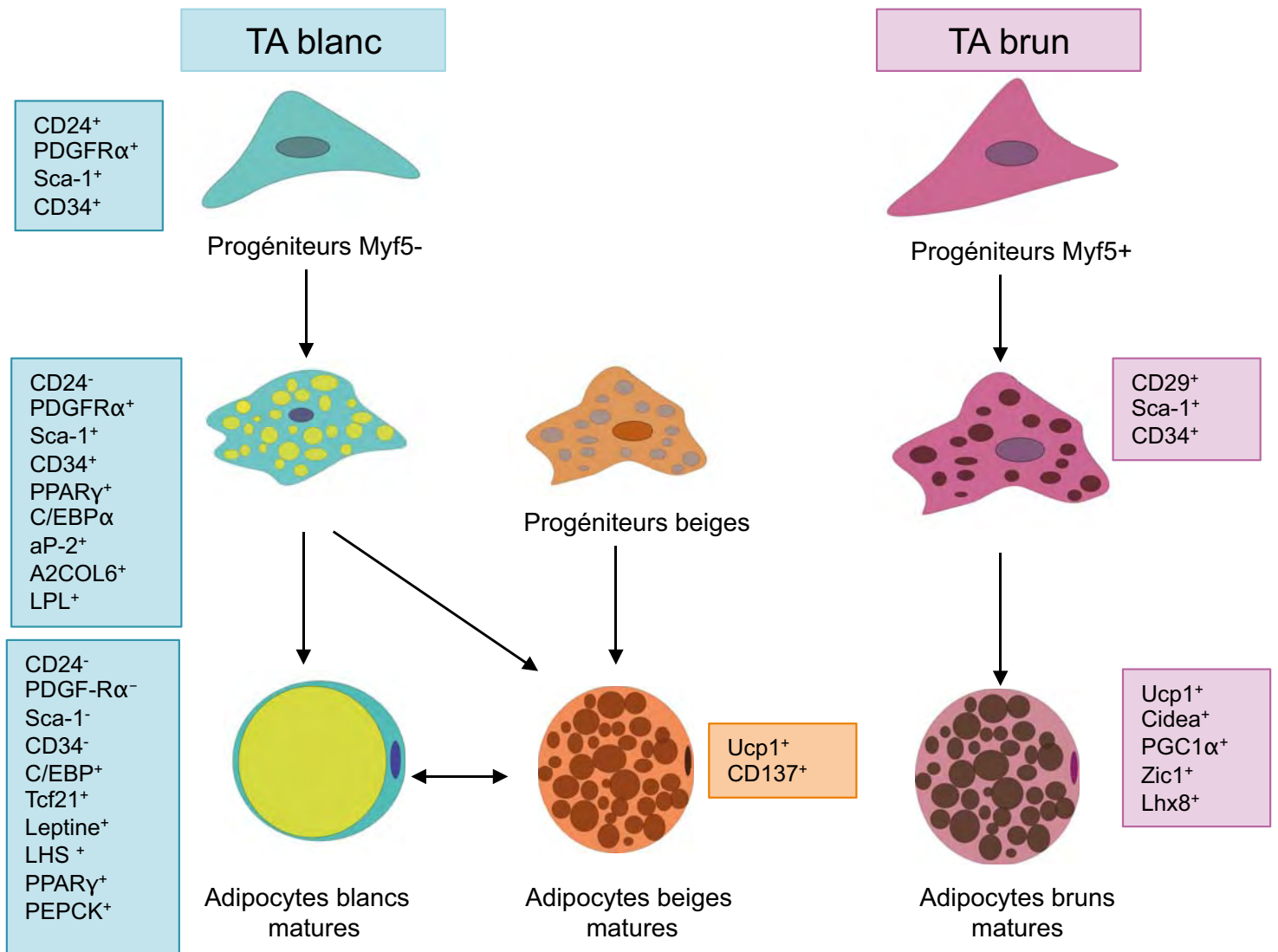
Certaines études proposent que les ASCs dérivent des péricytes perivasculaires <sup>30,31,32</sup>, alors que d'autres proposent une origine médullaire <sup>33,34,35,36</sup>, il est aujourd'hui admis que les ASCs sont PDGFR- $\alpha$  positives <sup>37</sup>. Rodheffer et coll proposent de distinguer les ASCs les moins engagées (les ASCs réellement « souches ») comme étant CD24<sup>+</sup>, alors que les ASCs plus engagées et adipocytes seraient CD24<sup>-</sup> <sup>30,37</sup>.

## 2. Les progéniteurs adipocytaires bruns

Pour les adipocytes bruns, les étapes de détermination et différenciation sont dépendantes de l'activation de voie de signalisation comme la voie Wnt ou la voie des BMP4 ainsi que de facteurs de transcription et co-régulateurs comme PRDM16, C/EBP, PGC1- $\alpha$ , PPAR  $\alpha$  /  $\gamma$  ainsi que des hormones thyroïdiennes <sup>38,39</sup> (*Fig. 8*).

Des études récentes ont révélé que le TA brun semble avoir une origine embryonnaire proche du muscle squelettique. En effet, les cellules musculaires squelettiques et les adipocytes bruns dériveraient d'un progéniteur commun Pax7<sup>+</sup> (facteur de transcription fortement activé au niveau des crêtes neurales) et Myf5<sup>+</sup> (gène de détermination myogénique) <sup>40</sup>.

Il est tout de même important de noter que la théorie sur l'origine des adipocytes bruns n'est pas aussi simple. En effet, Sanchez-Gurmaches et coll. montrent qu'il existe des progéniteurs d'adipocytes bruns qui sont Myf5<sup>-</sup> dans le TA brun péri-rénal ou péri-aortique <sup>41</sup>. Ainsi, l'origine des progéniteurs des adipocytes bruns pourrait être variable selon les dépôts.



**Figure 10: Origine des adipocytes blancs, beiges et bruns et leurs différents marqueurs de différenciation, chez la souris**

A2COL6 : chaîne alpha 2 du collagène de type 6 ; LHS : lipase hormono sensible ; PEPCK : PhosphoEnolPyruvate Carboxyl-Kinase ; aP2 : adipocyte lipid binding protein 2 ; C/EBP : CCAAT-enhancer-binding proteins ; Tcf21 : Transcription factor 21 ; LHS : Lipase Hormono Sensible ; PPAR : peroxysome proliferator activated receptor ; PDGFR : Platelet Derived Growth Factor Receptor.

*D'après Peirce, 2014; Berry, 2013; Timmons, 2007.*

### 3. Les progéniteurs beiges

Il est admis que l'apparition d'adipocytes beiges dans des dépôts blancs est induite par une mise au froid des animaux ou une stimulation  $\beta$ -adrénergique. L'activation de la différenciation beige peut également être dépendante de facteurs circulants comme le FGF21<sup>42</sup> ou les BMPs<sup>43</sup>. Il est important de noter que chez la souris, certains tissus adipeux sont plus à même de faire émerger des adipocytes beiges : le TA inguinal ou le TA rétro-péritonéal alors que d'autres dépôts comme le TA péri-gonadique « brunissent » plus difficilement<sup>16</sup>. La récente étude de Seale et coll. montre que PRDM16 permet d'obtenir un phénotype « adipocyte beige » à partir de progéniteurs adipocytaires blancs<sup>44</sup>. L'expression transgénique de PRDM16 dans des dépôts qui ne brunissent classiquement pas (tissu épidydimaire) entraîne l'apparition d'adipocytes beiges au sein de ces dépôts. Ce « brunissement » est associé à une perte de poids, et ce, même sous régime gras<sup>44</sup>.

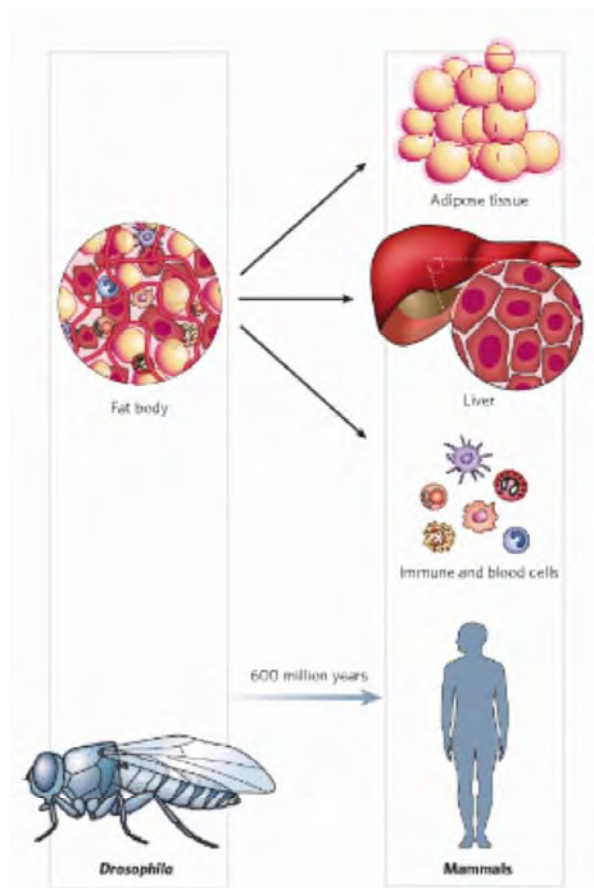
A ce jour, trois théories existent concernant l'origine des adipocytes beiges (Fig. 10).

i) La première théorie laisse penser que les adipocytes beiges proviendraient d'une transdifférenciation des adipocytes blancs en adipocytes beiges et inversement lors du retour à température ambiante<sup>45-47</sup>. Il n'y aurait donc pas, dans cette hypothèse, de progéniteurs beiges à proprement parlé.

ii) Une seconde théorie prône l'existence de progéniteurs « beiges » dans le TA blanc. Leur activation/différenciation en adipocytes beiges matures ne se ferait qu'après une mise au froid<sup>47</sup>. Ces progéniteurs sont caractérisés comme étant CD137<sup>+</sup> et TMEM26<sup>+</sup><sup>48</sup>.

iii) Enfin, une étude récente montre que l'adipocyte blanc et l'adipocyte beige proviendraient d'un progéniteur commun PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, Sca<sup>+</sup><sup>47</sup>.

Il est fort probable que les 3 hypothèses décrites ne soient pas exclusives et soient, en réalité, impliquées différemment selon les dépôts. En effet, la mise au froid activerait la transdifférenciation des adipocytes blancs en adipocytes beiges dans le TA sous-cutané inguinal *via* les récepteurs  $\beta$ 1-adrénergiques alors qu'il existerait des progéniteurs beiges dans le TA blanc épidydimaire qui se différencieraient suite à une activation  $\beta$ 3-adrénergique. On peut alors émettre



**Figure 11 : Tissu adipeux et moelle osseuse chez l'homme = corps gras chez la Drosophile**

Chez la *Drosophile*, le corps gras regroupe les cellules qui stockent l'énergie sous forme de TG ou de glycogène et les cellules impliquées dans la réponse immunitaire.

Chez l'homme, malgré la présence de 3 organes différents (foie, tissu adipeux et moelle osseuse), il existe un lien intime entre réponse métabolique et système immunitaire.

*De Hotamisligil, 2006*



l'hypothèse que l'origine des adipocytes beiges est différente selon l'équipement du TA en récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ( $\beta$ -1 ou  $\beta$ -3).

### **C. Les cellules immunitaires**

Les cellules immunitaires représentent environ 40 % des cellules de la SVF du TA blanc. Il n'est pas forcément surprenant de retrouver, dans un même tissu, des adipocytes, des cellules stromales mésenchymateuses, des cellules souches hématopoïétiques ainsi que les cellules immunitaires matures. En effet, chez la drosophile, il existe un lien intime entre immunité et métabolisme puisque le système hépatique, le système immunitaire et le TA cohabitent dans un même organe : le corps gras <sup>49</sup> (*Fig. 11*).

Parmi les cellules hématopoïétiques, on retrouve des cellules du lignage myéloïde (macrophages, mastocytes, éosinophiles, granulocytes), du lignage lymphoïde (lymphocytes T, NK, NKT et B, lymphocytes innés) et des cellules dendritiques. L'ensemble de ces cellules immunitaires joue un rôle fondamental dans i) la physiologie du TA (différenciation et fonctionnement des adipocytes) et ii) la physiopathologie (obésité, maladies métaboliques).

Des modifications qualitatives et quantitatives de ces populations immunitaires au sein de ce tissu participent ainsi à la mise en place d'un statut inflammatoire à bas bruit qui conduit à un dysfonctionnement adipocytaire et au développement des maladies métaboliques <sup>50</sup>. On observe ainsi au cours de l'obésité, une augmentation du nombre de macrophages associée à une polarisation vers un profil pro-inflammatoire (phénotype « M1 »), ainsi qu'une diminution du nombre de lymphocytes T régulateurs <sup>50</sup>. Par ailleurs, la sécrétion de cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, CCL2) par les macrophages « M1 » induit une insulino-résistance de l'adipocyte <sup>51</sup>. Enfin, les cellules immunitaires sont la cible d'un grand nombre d'adipokines sécrétées par les adipocytes (*Table 1*), illustrant l'existence d'un dialogue bidirectionnel entre ces deux cellules, pouvant devenir un véritable cercle vicieux <sup>50</sup>.

Il a également été montré que les cellules immunitaires pouvaient favoriser l'apparition d'adipocytes beiges dans le TA blanc, notamment *via* une production locale de prostaglandines ou d'IL4 <sup>52</sup>. Il a d'ailleurs été montré que les macrophages pouvaient augmenter le nombre d'adipocytes beiges et les activer. La déplétion de macrophages pendant la mise au froid empêche l'acclimatation des souris et donc le



« brunissement » des tissus adipeux blancs <sup>53</sup>. Lors de la mise au froid, la sécrétion d'IL-4 et de catécholamines par les macrophages augmente l'expression des gènes thermogéniques dans les TA blancs et bruns, permettant une réponse adaptée au froid.

De plus, plus récemment, il a été montré que lors de la mise au froid, l'activation et la synthèse d'IL-4 et d'IL-13 par les lymphocytes innés de type 2 (ILC2s) du TA, stimulait la prolifération des progéniteurs adipeux (PDGFR- $\alpha^+$ ) ainsi que l'activation des adipocytes beiges (expression de la protéine UCP1) <sup>54</sup>.

Les cellules immunitaires matures résidentes d'un tissu résultent du processus continu d'hématopoïèse. Jusqu'à récemment, il était admis que les cellules immunitaires présentes dans le TA étaient produites au niveau médullaire à partir de cellules souches hématopoïétiques et infiltraient le TA *via* la circulation sanguine. Ce dogme a été remis en cause au sein du laboratoire par les travaux de Poglio et coll. montrant la présence, dans le TA, de cellules souches hématopoïétiques fonctionnelles, caractérisées par le phénotype KLS (c-Kit<sup>+</sup>, Lin<sup>-</sup>, Sca-1<sup>+</sup>) <sup>55,56</sup>. Les cellules immunitaires du TA proviennent donc pour certaines, d'une hématopoïèse médullaire (20 à 40% des cellules immunitaires) et pour d'autres, d'une hématopoïèse locale *in situ*. On sait que les cellules souches hématopoïétiques du TA vont principalement donner les cellules de la lignée myéloïde résidentes du TA (macrophages, mastocytes) alors ce sont les KLS de moelle osseuse qui donnent les cellules lymphoïdes du TA <sup>57</sup>. Cependant, le rôle respectif de ces deux populations de cellules immunitaires au sein des TAs reste encore à déterminer.

*Les TA, qu'ils soient blancs ou bruns, renferment des progéniteurs adipeux (aux origines différentes), des adipocytes matures (aux fonctions métaboliques différentes) et des cellules immunitaires. Ces différents types cellulaires interagissent via la sécrétion de molécules (adipokines / cytokines) assurant le bon fonctionnement de ces tissus. Nous allons voir à présent que l'ensemble de ces interactions est indispensable pour l'organisation structurale de ces dépôts.*



<b>TA blanc viscéral</b>	Abdominal	Mésentérique
	Omental	Périogonadique
	Rétropéritonéal	Péri-rénal
<b>TA blanc sous-cutané</b>	Cranial	Inguinal
	Facial	
	Glutéal	
<b>TA brun</b>	Péri rénol	Péri-rénal
	Péricardique	Région péricardique
	Gros vaisseaux	Région interscapulaire
	Cervical	Cervical
		Médiastinal

**Figure 12 : Les différents noms des dépôts adipeux chez la souris et l'homme.**

### **III. Organisation des TA**

#### **A. Localisation des différents dépôts adipeux**

##### *1. Les différents TA blancs*

Le TA blanc est constitué d'un grand nombre de dépôts, plus ou moins développés et dénommés différemment selon l'espèce étudiée (*Fig. 12*). De manière générale, selon leur localisation anatomique, on distingue les dépôts sous-cutanés, logés entre la couche musculaire et la peau (quantitativement les plus importants puisqu'ils représentent environ 80% du TA blanc total) des dépôts profonds (ou viscéraux).

Ces dépôts sont impliqués de manière différente dans la mise en place de l'obésité et des complications associées : classiquement, les dépôts profonds sont vus comme délétères alors que les dépôts sous-cutanés sont plutôt considérés comme protecteurs <sup>58</sup>. Il a, par exemple, été montré qu'en cas d'obésité, l'implantation de TA blanc sous-cutané dans la cavité péritonéale entraînait une amélioration du métabolisme (inversement à la greffe du TA blanc viscéral en position sous-cutanée) <sup>58</sup>. Les TA blancs diffèrent par i) leur équipement en récepteurs adrénergiques ( $\beta 1/\beta 3$  et  $\alpha$ ), ii) leur sensibilité à l'insuline, iii) leurs sécrétions, iv) le nombre de progéniteurs et v) le nombre et les différentes populations immunitaires qu'ils contiennent.

La différence entre TA blanc sous-cutané et TA blanc viscéral pourrait s'expliquer par la présence de progéniteurs différents. En effet, même s'il est admis que les progéniteurs adipeux blancs ont pour origine les feuilletés mésodermique ou neuroectodermique (pour le TA blanc sous-cutané de la face), il a été montré que les TA blancs viscéral vs sous-cutané présentent des patterns d'expression génique différents <sup>59,60,61</sup>. Ces différences concernent des gènes impliqués dans le développement : gènes Homéobox (HoxC8, HoxC9, HoxA5), facteurs de transcription impliqués dans la différenciation cranio-faciale au cours du développement (Tbx15) ou encore des facteurs solubles de la voie Wnt (Sfrp2) <sup>59</sup>. Il existe ainsi même une forte corrélation entre l'augmentation de l'expression des gènes HoxA5 et Tbx15 et l'indice de masse corporelle « obèse » <sup>59</sup>. Ainsi les gènes Tbx15, HoxC9 sont plus exprimés par les progéniteurs adipocytaires et adipocytes issus du TA sous-cutané alors que les gènes Sfrp2, HoxA5, HoxC8 sont plus



exprimés par les progéniteurs adipocytaires et adipocytes issus du TA viscéral. Ces différences d'expression génique sont maintenues en culture suggérant une relative indépendance par rapport à l'environnement. Ces résultats suggèrent donc que les différents précurseurs adipeux sont responsables de la spécificité du TA qu'ils forment <sup>62</sup>.

Il convient de noter que ces différences varient en fonction des espèces et du sexe étudié, mais qu'on retrouve quelques similitudes. Par exemple, chez l'homme on retrouve les mêmes différences d'expression pour les gènes HoxA5, HoxC8 entre TA sous-cutané et viscéral, que chez la souris. Les gènes Tbx15 et Sfrp2 sont, respectivement, d'avantage exprimés dans les TA viscéral et sous-cutané chez l'homme. L'expression d'HoxC9 est dépendante du sexe puisque plus importante dans le TA sous-cutané humain uniquement chez les femmes <sup>59</sup>.

## 2. Les TA bruns

On a longtemps pensé que, dans l'espèce humaine, les adipocytes bruns étaient uniquement présents chez le nouveau-né <sup>63</sup>. Chez l'homme adulte, la découverte d'adipocytes bruns en 1970 dans des régions différentes (rein, surrénale, cœur, aorte) de celles chez le rongeur est longtemps restée sous silence <sup>64</sup>. Depuis 2007, il a été mis en évidence, grâce à la tomographie par émission de positron avec du fluorodeoxyglucose, la présence certaine de TA brun chez l'homme adulte, en région péri-rénale, péricardique, autour des gros vaisseaux, mais également au niveau cervical <sup>65</sup> (*Fig. 12*). Depuis, il a été montré que l'activité de ce TA brun chez l'homme, était inversement corrélée à l'indice de masse corporelle <sup>66</sup>. Au regard de sa capacité à brûler un grand nombre de calories grâce à la thermogenèse, la découverte du TA brun chez l'homme adulte a permis d'envisager ce tissu comme une cible thérapeutique de choix dans le traitement de l'obésité et des complications associées.

Chez la souris, le TA brun a de multiple localisations : les régions interscapulaire, péri-rénale, cervicale, médiasténale et péricardique <sup>16</sup> (*Fig. 12*). Même s'il existe plusieurs localisations de TA bruns, à la différence des TA blancs, aucune différence fonctionnelle n'a été reportée entre les différents TA bruns.





## **B. Structure des TA**

### *1. Lobules et ganglion lymphatique*

L'ensemble des études sur le développement des TA a été faite dans les années 60-80. Longtemps considéré comme un tissu sans intérêt, l'organisation globale a été très peu étudiée. Toutefois, en 1960, Wassermann montre qu'au sein d'un dépôt adipeux blanc, les adipocytes se localisent en clusters, appelés lobules <sup>67</sup>. Ces lobules sont séparés les uns des autres par une matrice extracellulaire (MEC) <sup>68</sup>. A 17 jours *in utero*, le TA brun renferme déjà des adipocytes organisés en lobules <sup>69</sup>. Cependant, l'organisation précise de ces lobules ainsi que leurs rôles au sein du TA ne sont pas, aujourd'hui, connus.

Certains dépôts blancs hébergent des ganglions lymphatiques (TA inguinal et mésentérique) alors que la majorité des autres TA n'en possède pas. Il faut aussi noter que le TA inguinal est associé à la glande mammaire. Ces différences d'organisation (organisation ou non en lobules, présence ou absence de ganglion) pourraient provenir des différences dans le développement des TA, que nous verrons plus tard.

### *2. L'innervation des TA*

#### *a) L'innervation du TA blanc : activation de la lipolyse*

Le TA blanc renferme un grand nombre de fibres nerveuses sympathiques, immunopositives pour la TH (tyrosine hydroxylase, enzyme limitante de la synthèse de la noradrénaline) et des fibres sensorielles, immunopositives pour le CGRP (Calcitonin Gene Related Protein) et/ou la substance P <sup>70</sup>. Jusqu'à aujourd'hui, la présence et le rôle de l'innervation du TA blanc par le système nerveux autonome parasympathique reste débattue <sup>70</sup>.

L'innervation sympathique *via* la libération de noradrénaline et l'activation entre autre des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques est capable de stimuler la lipolyse <sup>71-73</sup>. Elle contrôle également l'activité sécrétoire des adipocytes en diminuant par exemple la synthèse et la sécrétion de leptine, ou d'adiponectine <sup>74</sup>. Des expériences de dénervation (chirurgicale ou pharmacologique) montrent que cette innervation sympathique régule aussi les processus de prolifération et différenciation des progéniteurs adipocytaires <sup>75-77</sup>. Des effets néanmoins opposés sont obtenus avec la noradrénaline et le NPY, autre neurotransmetteur libéré par les fibres



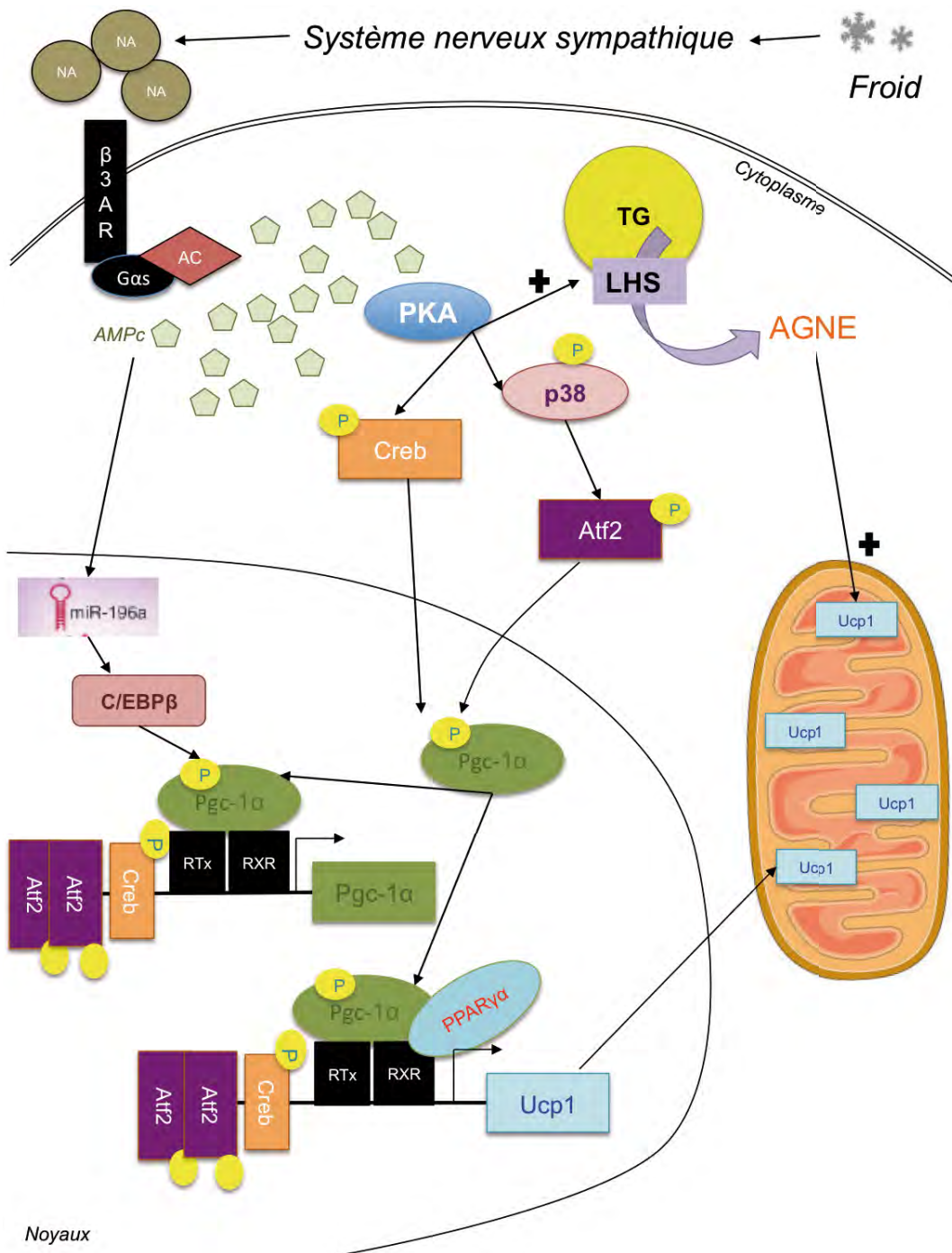
sympathiques <sup>78</sup>. Parallèlement à ce contrôle direct des adipocytes et des ASCs, le système nerveux autonome sympathique innerve densément les vaisseaux sanguins de type artère ou artériole <sup>79</sup>. L'activation de cette innervation au niveau du TA blanc inguinal par stimulation électrique augmente la perméabilité vasculaire *via* les récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques, permettant ainsi aux acides gras libérés lors de la lipolyse (stimulée également par la noradrénaline) d'être distribués aux organes *via* le système sanguin <sup>80</sup>.

Concernant le rôle des fibres sensorielles présentes dans le TA blanc, très peu de choses sont connues. Quelques données de la littérature montrent leur rôle pour informer le cerveau de l'état des stocks lipidiques. Une destruction sélective et bilatérale de ces fibres sensorielles au niveau du TA blanc épидидymaire, entraîne une augmentation du poids des autres dépôts de TA blanc. Cette augmentation se fait dans une proportion qui compense le déficit lipidique équivalent à celui induit par une lipectomie du même dépôt <sup>81</sup>. En revanche, cette même destruction pharmacologique des fibres nerveuses sensorielles n'entraîne pas de prolifération des progéniteurs adipocytaires, ni le nombre d'adipocytes matures <sup>75</sup>. Par ailleurs, l'injection de leptine directement dans le TA blanc augmente significativement l'activité électrique des afférences sensorielles provenant du dépôt injecté et provoque une augmentation de l'activité sympathique du dépôt controlatéral suggérant l'existence d'un arc réflexe <sup>82-84</sup>. Cependant, aucune étude ne statue vraiment sur le rôle physiopathologique de ces fibres sensorielles.

#### b) L'innervation du TA brun : activation de la thermogénèse

En 1968, à l'aide de la microscopie électronique, Bargmann et coll. mettent en évidence une innervation sympathique du TA brun grâce à la présence de varicosités (caractéristiques de l'innervation sympathique), et la présence de cellules gliales périphériques ou cellules de Schwann <sup>85</sup>.

Grace à la dénervation sympathique unilatérale du TA brun, Bartness et coll. montrent, chez le hamster de Sibérie, que l'innervation sympathique du TA brun est responsable de l'augmentation de l'expression d' Ucp1 et du flux sanguin ainsi que d'une mitochondriogenèse <sup>86</sup>. Après une mise au froid, la masse de TA brun augmente considérablement. En absence d'innervation sympathique fonctionnelle, les animaux ne peuvent pas s'acclimater à une exposition au froid <sup>86</sup>.



**Figure 13 : Actions de la noradrénaline lors de la thermogénèse**

Lors de la mise au froid, l'activation du système nerveux sympathique entraîne l'exocytose de noradrénaline (NA), qui se fixe aux récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. L'activation de ces récepteurs active l'adénylate cyclase (AC), qui augmente alors l'AMPc, augmentant ainsi l'activité de Atf2 et Pgc-1 $\alpha$ , qui vont être transloqués au noyau et activer la transcription des gènes impliqués dans la thermogénèse, dont Ucp1. PGC-1 $\alpha$ , en se liant à l'ADN grâce aux interactions avec PPAR- $\alpha$  et  $\gamma$  (récepteurs aux rétinoïdes X (RXR) et récepteurs aux hormones thyroïdiennes (RTx)) augmente la transcription d'Ucp1. La noradrénaline augmente le nombre de miRNA 196a, ce qui a pour conséquence d'augmenter l'expression de C/EBP $\beta$ , favorisant ainsi l'expression des gènes thermogéniques.

Adapté de Harms, 2013

Lors d'une exposition au froid, le système nerveux sympathique activé libère de la noradrénaline. L'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques qui en résulte, entraîne, *via* une signalisation  $G_{\alpha_s}$ /adenylate cyclase/PKA, une phosphorylation de la protéine p38MAPK (p38 mitogen activated protein kinase), qui va phosphoryler à son tour ATF2 (Activating Transcription Factor 2) et PGC1 $\alpha$  <sup>87</sup>. La phosphorylation de ces deux derniers facteurs stimule l'activité transcriptionnelle d' Ucp1 <sup>88</sup> (*Fig. 13*). L'activation de PKA stimule aussi la lipolyse de l'adipocyte brun (comme c'est le cas dans l'adipocyte TA blanc). Les conséquences de l'activation des récepteurs adrénergiques sont donc multiples :

- une augmentation de la transcription d'Ucp1
- une activation de la lipolyse *via* l'activation de la LHS entraînant la libération d'acides gras dans le cytoplasme. Ces acides gras, vont permettre d'activer la protéine Ucp1, alors que le GDP l'inhibe <sup>89</sup>. La quantité de protéine Ucp1 à la membrane mitochondriale peut également être augmentée par les hormones thyroïdiennes et l'acide rétinoïque <sup>90,91</sup>.
- une augmentation du nombre de mitochondries *via* PGC1- $\alpha$ ,
- une prolifération des progéniteurs bruns <sup>92</sup>.

Plus récemment, Giordano et coll montrent, chez le rat, qu'une innervation parasympathique du TA brun pourrait exister (uniquement dans le dépôt médiastéral et péricardique) grâce au marquage des transporteurs vésiculaires à l'acétylcholine et qu'elle pourrait être impliquée dans la thermogenèse <sup>93</sup>. Tout comme pour le TA blanc, la réelle implication de cette innervation dans le contrôle du métabolisme du TA brun est aujourd'hui très peu étudiée.

En 1988, Norman et coll et Lever et coll. mettent en évidence la présence d'une innervation sensorielle <sup>94,95</sup>. En effet, un marquage de la Substance P et du CGRP est retrouvé dans le parenchyme du TA brun ainsi qu'autour des vaisseaux. Grâce à une dénervation spécifiquement sensorielle, Bartness et coll. mettent en évidence que la dénervation sensorielle de ce tissu entraîne une diminution de la masse du TA brun et une diminution de la quantité d' Ucp1 <sup>86</sup>. Cependant, l'implication de cette innervation dans le contrôle de la thermogenèse reste méconnue, même si on peut imaginer que ces fibres nerveuses soient en capacité de percevoir les variations de chaleur produite par le TA brun.



### 3. Vascularisation des TA

Les TA blancs et bruns sont des tissus très vascularisés <sup>96</sup>. En effet, il est important que le TA brun soit densément vascularisé puisque c'est grâce à la vascularisation que les adipocytes bruns reçoivent les nutriments et oxygène, indispensables pour assurer la thermogenèse. C'est également grâce aux vaisseaux sanguins que la chaleur produite par les adipocytes bruns va se dissiper et augmenter la température corporelle.

Le lien entre la vascularisation et la fonction des TA est fondamental comme le montrent un certain nombre d'études : ainsi, lorsque des souris sont mises au froid, les dépôts de TA brun présentent une période d'angiogenèse active afin de permettre la dissipation de la chaleur produite <sup>96</sup>. Indépendamment de cela, l'inactivation du VEGF-A (facteur angiogénique) spécifiquement dans les TA (blanc et brun) entraîne une diminution du nombre de mitochondries, ainsi qu'une diminution de l'expression d'*Ucp1* et de *Pgc1a*, ayant pour conséquence tissulaire un « blanchiment » du TA brun <sup>97</sup>.

### C. Mise en place des TA

Très peu d'études s'intéressent au développement des TA. Il est décrit que le TA blanc est un des derniers tissus à se mettre en place, et que ce développement tardif est dépendant de l'espèce et du dépôt (viscéral, sous-cutané). Par exemple, chez le rongeur, le TA blanc inguinal apparaît à la naissance alors que chez l'humain, ce dernier se met en place pendant la quatorzième semaine de gestation. Le TA brun, lui, apparaît dès le 14<sup>ème</sup> jour de gestation, chez le rat <sup>69</sup>.

La mise en place du TA blanc se fait à partir de structures appelées « organes primaires » réticulés alors que l'émergence du TA brun se fait à partir d'un « organe primaire » compact <sup>69</sup>. Les organes primaires réticulés sont en fait une accumulation de matrice extracellulaire (MEC), non organisée, hébergeant des cellules endothéliales ainsi que des cellules au profil fibroblastique (cellule allongée avec de nombreux prolongements cytoplasmiques capables de sécréter les constituants de la MEC) <sup>98 99</sup>.

Par ailleurs, il a été montré que lors du développement embryonnaire du TA blanc, la néo-vascularisation et l'adipogenèse étaient couplés spatio-temporellement. En fonction des espèces et des TA, il a été montré que l'angiogenèse précédait





l'adipogenèse ou inversement <sup>99</sup>. En 1985, Nnodim et coll. montrent que le TA brun se développe dans une zone pré-déterminée par un dense réseau vasculaire très bien organisé <sup>69</sup>.

Enfin, Han et coll. montrent en 2011 que les macrophages sont indispensables au développement du TA blanc épидидymaire. En effet, l'utilisation de clodronate (modèle d'ablation pharmacologique des macrophages) inhibe le développement de ce TA <sup>100</sup>.

*Nous venons de voir que le fonctionnement précis des TA blanc et brun est très étudié. La mise en place et le fonctionnement de ces tissus sont contrôlés par l'innervation et la vascularisation. Cependant, il existe des différences structurales ou organisationnelles entre ces dépôts, mais elles sont peu décrites et étudiées. Il semble pourtant nécessaire de comprendre ces différences, puisqu'elles pourraient expliquer les différences fondamentales de fonctionnement.*

## **IV. Plasticité des TA**

### **A. Surdéveloppement du TA blanc lors de l'obésité**

Chez l'adulte, le TA blanc est très plastique puisqu'il est capable de s'hyperdévelopper (obésité) ou de s'atrophier (cachexie). L'expansion pathologique du TA blanc est possible par i) une augmentation du nombre d'adipocytes blancs (hyperplasie des adipocytes), ii) une augmentation du volume de chaque adipocyte blanc (hypertrophie), iii) une modification du pourcentage des cellules immunitaires au sein du TA, iv) une augmentation de la vascularisation. A terme une fibrose se met en place entraînant un état « figé » du TA <sup>67,68,101</sup>. L'inhibition de l'angiogenèse par un anticorps neutralisant contre le récepteur 2 du VEGF inhibe l'adipogenèse, *in vitro* et *in vivo* <sup>102</sup>. La vascularisation joue donc un rôle fondamental dans l'homéostasie du TA chez l'adulte. Fukumura et coll. montrent qu'en bloquant l'adipogenèse par la transfection d'un dominant négatif de PPAR-γ dans les ASCs, l'angiogenèse est alors inhibée <sup>102</sup>. Par ailleurs, l'inhibition de l'angiogenèse, chez des souris sous régime gras ou déficientes pour la leptine, limite la croissance



de leur TA et diminue l'insulino-résistance des adipocytes<sup>103,104,105</sup>. L'adipogenèse et l'angiogenèse semblent donc être deux processus étroitement liés et complémentaires au sein du TA adulte<sup>103,106</sup>.

### **B. Emergence d'un TA brun dans un TA blanc**

Comme nous l'avons vu précédemment, beaucoup d'études s'intéressent aujourd'hui à l'origine des adipocytes Ucp1 -positifs présents dans les tissus adipeux blancs. Cependant, si la littérature rapporte que la capacité à brunir des différents dépôts adipeux est variable (*cf Chapitre 1, paragraphe II, A, 3*), aujourd'hui, aucune étude ne s'intéresse à la localisation précise de ces adipocytes au sein d'un dépôt TA blanc. On peut donc se demander si ces adipocytes beiges émergent de manière uniforme dans la totalité du TA ou au contraire dans des régions précises.

### **C. Forte activation du TA brun lors de la cachexie**

La cachexie est souvent associée à des pathologies comme le diabète ou le cancer. Elle est caractérisée par une perte de 5% de la masse corporelle en 1 an, une inflammation chronique ainsi qu'une atrophie des dépôts musculaires et adipeux<sup>107</sup>. Cette cachexie est souvent associée à une forte activation du TA brun<sup>108</sup> ainsi qu'une atrophie et un « brunissement » des dépôts adipeux blancs dépendant de l'IL6<sup>109</sup>. L'augmentation du « brunissement » pourrait permettre à l'organisme de combattre l'hypothermie résultant de la perte d'isolation due à la diminution de la masse grasse et de la masse musculaire<sup>110</sup>.

### **D. Comportements des TA après lipectomie**

Le terme « plastique » appliqué au tissu adipeux blanc suggère qu'il repousse après lipectomie (ablation partielle du TA). Il a été montré que la masse de l'organe adipeux de l'individu est identique avant et après lipectomie (chez l'homme, la souris, le rat, le hamster de Sibérie)<sup>111</sup>. Cependant, la récupération de la masse grasse ne se fait pas à l'endroit où a été enlevé le dépôt, mais par croissance compensatrice des autres dépôts. Ainsi, l'organisme maintient constante sa masse grasse totale et non la masse grasse de chaque dépôt. Ceci est comparable à la



« régénération » hépatique où l'ablation d'un lobe sera compensée par un accroissement des autres lobes <sup>112</sup>. De plus, la répartition adipeuse sera différente en fonction du dépôt lipectomié <sup>113</sup>.

Concernant la possible « repousse » du TA excisé, il y a très peu d'études disponibles dans la littérature. En 1983, une étude chez le lapin montre tout de même qu'après excision d'un grand nombre de dépôt adipeux (péri-rénal, dorsoscapulaire, omental et inguinal), seul le TA blanc péri-rénal peut régénérer entièrement, 6 mois après lipectomie <sup>114</sup>. Il a également été montré, chez le rat, que le TA inguinal pouvait régénérer, à condition qu'une lipectomie d'autres dépôts ait lieu <sup>111,115</sup>.

Comme c'est le cas chez la souris, le rat ou le hamster, chez l'homme, la liposuction comme la dermolipectomie ne sont pas suivies d'une régénération des dépôts enlevés, à condition que le régime alimentaire ne soit pas hypercalorique. Dans ce cas, les lobules retirés ne régénèrent pas mais les lobules restants s'hypertrophient (comme c'est le cas pour le foie, par exemple) (discussion avec chirurgiens plastiques de l'hôpital Rangueil, Toulouse).

### **E. Le TA en chirurgie reconstructrice et esthétique**

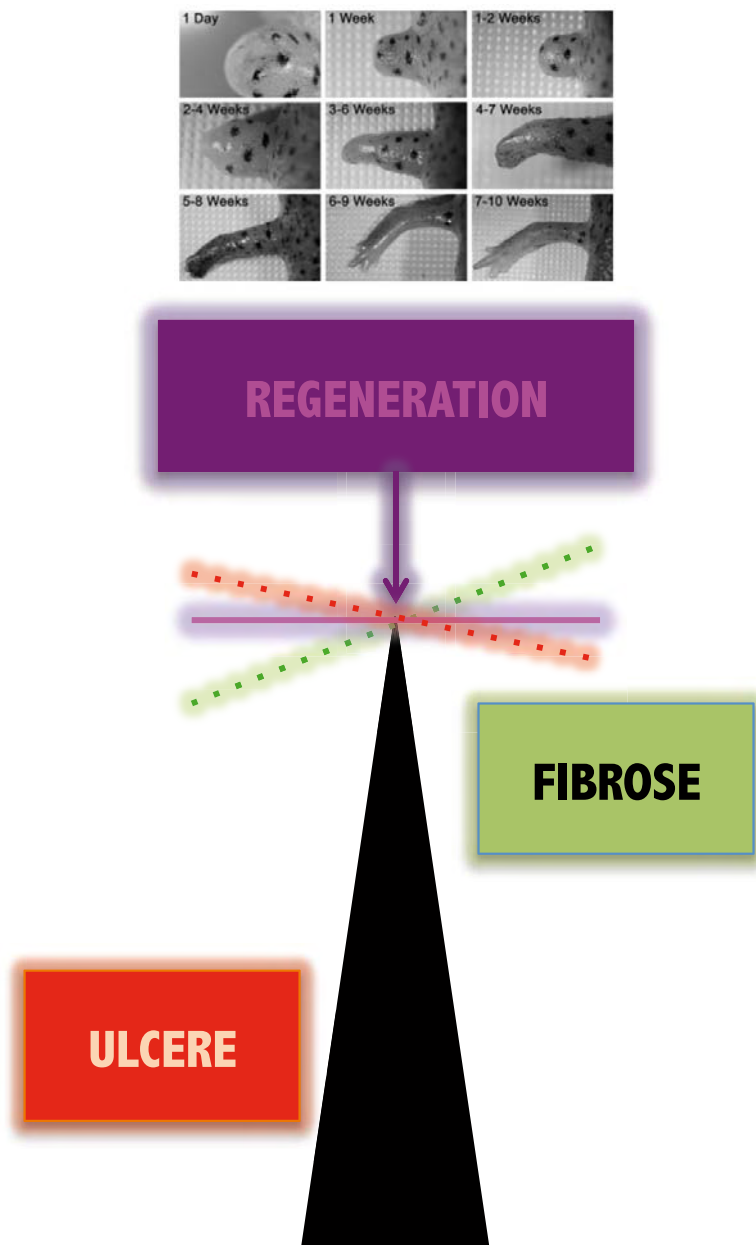
Depuis longtemps, le TA est également utilisé en médecine reconstructrice. Le premier cas de greffe autologue en médecine reconstructrice du visage date du début du vingtième siècle. C'est dans les années 2000s, que cette technique a été développée pour la reconstruction mammaire post-mastectomie (20 000 femmes par an en France). La greffe autologue de TA est, depuis, couramment utilisée que ce soit en chirurgie reconstructrice mais également en chirurgie esthétique pour l'augmentation de volume mammaire pour les femmes de moins de 35 ans ou dans le cas de reconstruction de la face <sup>116,117</sup>.

Il est important de noter que les résultats après les greffes sont mitigés puisque le volume de TA greffé évolue au cours du temps. En effet, Delay et coll. observent une perte progressive d'environ 30 % du volume apporté. Le volume finit par se stabiliser après environ 3 à 4 mois <sup>118,119</sup>. Cette greffe autologue est aujourd'hui utilisée aussi en association à d'autres techniques comme la reconstruction par prothèse ou par lambeau, permettant un meilleur résultat visuel. Il est important de noter (pour le reste du manuscrit) que la greffe autologue peut être



utilisée pour diminuer le syndrome douloureux post-mastectomie <sup>116</sup>. Même si 64% des femmes sont satisfaites 6 mois après la greffe autologue de TA, 51% des patientes ont besoin de plusieurs procédures pour l'obtention de résultats satisfaisants <sup>116</sup>. Aujourd'hui, il apparaît indispensable de comprendre comment le TA pourrait être maintenu après greffe ou d'être capable de le faire régénérer dans une région où il était présent avant ablation de la tumeur.

*Longtemps considéré comme un tissu inerte, nous venons de voir que les TA sont de véritables tissus aux multiples fonctions et aux multiples localisations. Composés de différents types cellulaires (adipocytes, progéniteurs adipocytaires, cellules immunitaires), ces TA exercent des rôles indispensables à l'organisme : stockage et libération d'énergie sous forme de TG, adaptation au froid par production de chaleur, ... De ce fait, ces TA sont considérés comme extrêmement plastiques. Cependant, leur organisation, comme leur mise en place, restent aujourd'hui peu étudiées. Pourtant cette organisation semble conditionner le rôle des TA en physiopathologie (obésité, cachexie, ...). C'est pour l'ensemble de ces raisons, qu'au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'organisation du TA ainsi qu'à sa plasticité.*



**Figure 14 : La régénération, réparation parfaite résultant d'un subtil équilibre de processus cellulaires et moléculaires**

Le moindre déséquilibre entraîne une rupture dans la structure anatomique et la fonction. Ainsi on peut observer que la réparation tissulaire peut entraîner i) une cicatrisation ou fibrose par un dépôt excessif de matrice extra-cellulaire sur la zone de lésion ou ii) un ulcère caractérisé par une plaie en permanence « ouverte » dont la cause est une inflammation de bas bruit qui dure dans le temps. Lors de la régénération, une étape de cicatrisation est nécessaire afin que la lésion soit obturée, mais cette cicatrisation est temporaire.

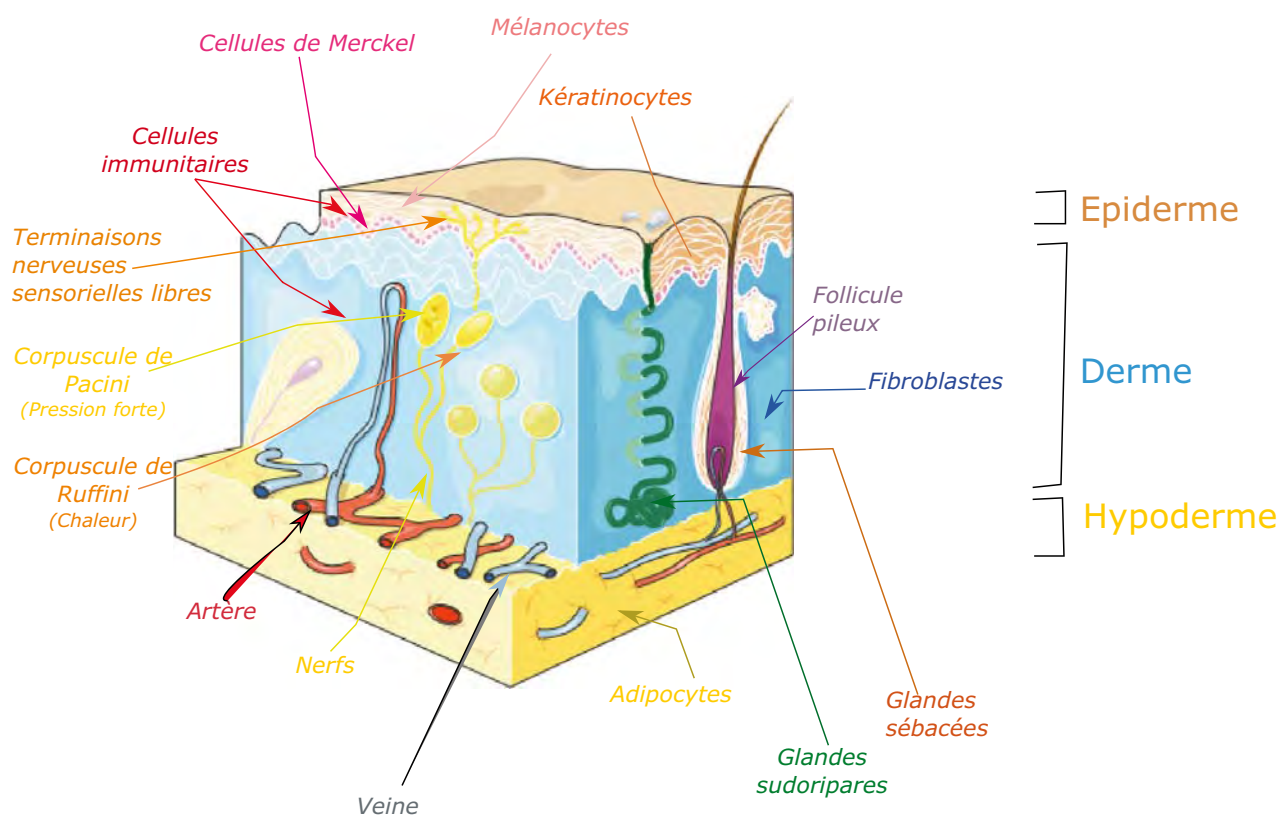


# **Chapitre II:**

## ***La régénération et ses principes***

Etymologiquement, le mot régénération vient du latin *regenerare* et signifie faire revivre / ressusciter. En 1712, le terme « régénération » introduit par Réaumur désignait donc un phénomène insolite et miraculeux. Aujourd'hui, le terme de régénération ne signifie pas faire renaître à la vie un être mais reste pourtant très ambitieux et prometteur puisque la régénération se définit comme une réparation tissulaire parfaite qui permet un retour de l'intégrité des organismes après une lésion ou la perte d'un organe ou d'un membre. La régénération correspond donc à la reconstruction à l'identique de ce qui a été perdu ou détruit que ce soit naturellement, accidentellement ou expérimentalement. Pour que la régénération ait lieu, les mécanismes « classiques » de développement embryonnaire s'orchestrent dans le temps et dans l'espace : prolifération cellulaire, mort cellulaire programmée, migration, détermination et différenciation (on peut même parler de morphogenèse post-embryonnaire) associés à des processus spécifiques à la régénération tels que la dédifférenciation. Cependant, la réparation tissulaire peut ne pas être parfaite. On parle alors de cicatrisation. Cette dernière, si elle n'est pas transitoire et contrôlée, peut conduire à une fibrose (cicatrice hypertrophique) ou à un ulcère (plaie en permanence ouverte) (*Fig. 14*).

La régénération existe en fait à des échelles biologiques bien différentes. En effet, il est possible de régénérer à i) l'échelle cellulaire (c'est le cas des axones neuronaux ou des fibres musculaires), ii) à l'échelle tissulaire (c'est le cas de la régénération physiologique ou renouvellement des épithéliums cutané ou intestinal), iii) à l'échelle de l'organe (c'est le cas de la régénération de la patte chez la salamandre, de la nageoire chez le poisson, de la tête chez l'hydre), iv) à l'échelle de l'individu entier : c'est le cas de la régénération du vers planaire par exemple <sup>120</sup>. Nous n'envisagerons pas, dans le reste du manuscrit, la régénération à l'échelle cellulaire ainsi que la régénération de type « renouvellement physiologique ».



**Figure 15 : La peau : organe complexe**

La réponse biologique suite à une lésion tissulaire permet de distinguer les individus en deux classes<sup>121,122</sup>, ceux dotés de la capacité à régénérer et ceux qui en sont dépourvus. Chez le mammifère adulte il existe un renouvellement tissulaire mais, après une lésion massive, ce sont des mécanismes de cicatrisation et de fibrose qui se mettent en place dans la majorité des cas. La réponse vitale, qu'est la régénération, suscite aujourd'hui des études pluridisciplinaires (physiologiques, cellulaires, moléculaires), qui pourraient déboucher sur des applications médicales et thérapeutiques chez l'homme, espèce ayant perdu sa capacité naturelle à régénérer après lésion ou ablation massive.

Dans un premier temps, nous étudierons les mécanismes impliqués dans la cicatrisation chez l'homme pour pouvoir aborder dans un second temps, les processus de régénération chez les vertébrés inférieurs.

## **I. Réparation tissulaire : cicatrisation chez les mammifères adultes**

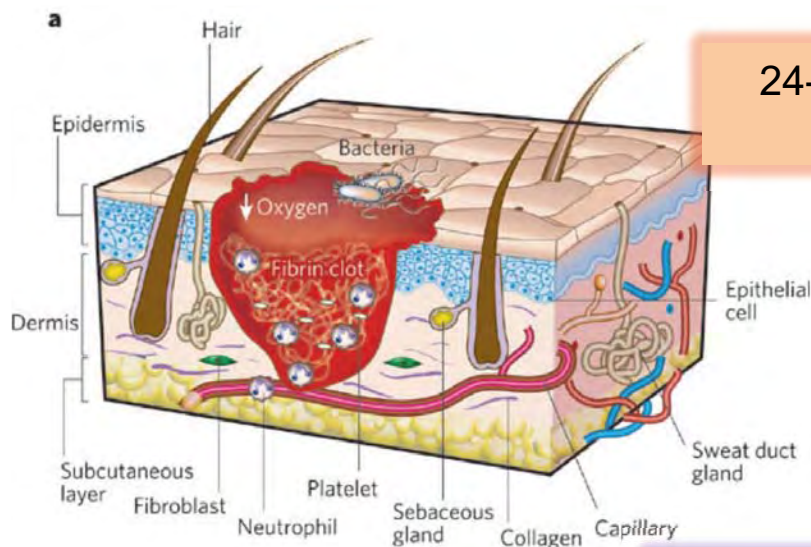
Pour comprendre les processus mis en place après lésion chez les mammifères adultes, nous prendrons l'exemple de la cicatrisation de la peau.

La peau est l'organe le plus souvent lésé, pourtant, le maintien de son intégrité est indispensable puisque la peau constitue une barrière entre le milieu extérieur et l'organisme. Elle protège ainsi l'organisme contre les pathogènes et évite sa déshydratation. Chez le mammifère, après une lésion, la peau cicatrise.

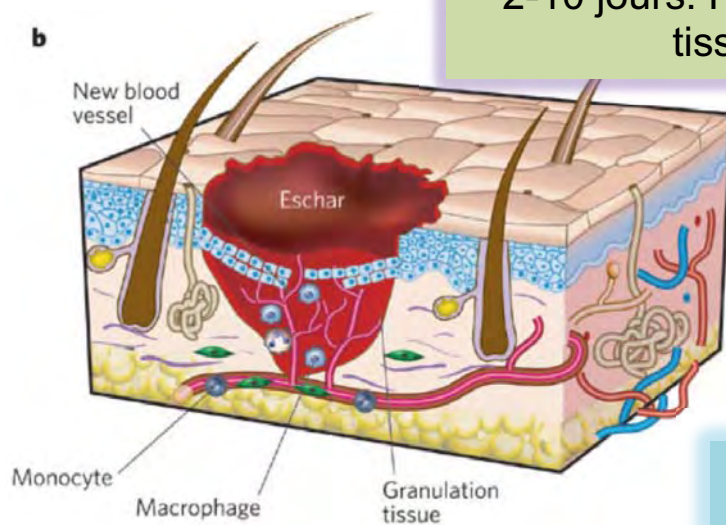
Par son importance physiologique et par sa facilité d'étude (organe en surface), ce tissu est très utilisé pour essayer de comprendre pourquoi les mammifères ont développé des processus de cicatrisation au détriment des processus de régénération.

### **A. Structure de la peau**

La peau est un organe complexe composé de l'épiderme (origine ectodermique), du derme et de l'hypoderme (origine mésodermique) (*Fig. 15*). L'épiderme est composé de 90% de kératinocytes mais également de mélanocytes (responsable de la pigmentation de la peau), de cellules de Langerhans (cellules immunitaires présentatrices d'antigènes) et de cellules de Merkel

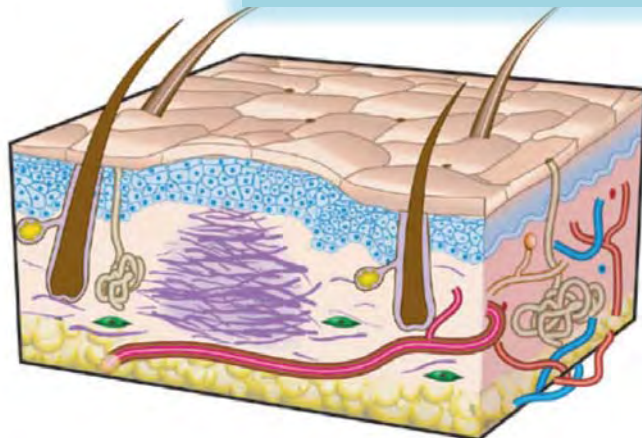


24-48 h : Hémostase + phase pro-inflammatoire



2-10 jours: Phase anti-inflammatoire + tissu de granulation

10 jours -1 an:  
Remodelage tissulaire



**Figure 16 : La cicatrisation cutanée**

La cicatrisation cutanée se fait en 3 phases :

- Inflammation : après la formation du caillot de fibrine, les cellules de l'immunité innée (macrophages, neutrophiles) éliminent les déchets tissulaires / cellulaires et protègent l'organisme de pathogènes.
- Mise en place du tissu de granulation : un nouveau tissu se constitue 48 h après la lésion. Les processus de ré-épithélialisation et d'angiogenèse se mettent en place en réponse à l'inondation de cytokines pro-inflammatoires. Les fibroblastes résidents ou circulants, deviennent myofibroblastes et sécrètent de la MEC.
- Phase de remodelage tissulaire : la majorité des cellules présentes dans les étapes précédentes rentrent en apoptose, laissant ainsi une masse acellulaire composée majoritairement de collagène de type I.

*Adapté de Gurtner, 2008*

(mécanorécepteurs cutanés). Comme tous les épithéliums, l'épiderme n'est pas vascularisé. Le derme est composé de fibroblastes (qui sécrètent les composants de la matrice extracellulaire (MEC) particulièrement les collagènes de type I et III), de cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes, mastocytes), d'annexes cutanées (follicules pileux, glandes sébacées, glandes sudoripares et ongles) ainsi que de vaisseaux sanguins et de fibres nerveuses (*Fig. 15*). L'hypoderme est constitué d'adipocytes ainsi que de collagène (*Fig. 15*).

## **B. Les différentes étapes de la cicatrisation cutanée**

Après une lésion chez le mammifère, la cicatrisation, qui se caractérise par une réparation tissulaire avec perte de fonction et formation d'une cicatrice, est composée de différentes phases que nous allons décrire dans ce chapitre (*Fig. 16*).

### *1. L'hémostase*

Lorsqu'il y a blessure, il est indispensable d'arrêter le saignement : c'est le phénomène d'hémostase. L'hémostase permet de stopper les hémorragies et empêcher les thromboses. Celle-ci peut être décomposée en 3 étapes successives<sup>123</sup> (*Fig. 17*):

- i) **L'hémostase primaire** : fermeture de la brèche vasculaire grâce au clou plaquettaire. Elle résulte d'une vasoconstriction locale afin de réduire le flux sanguin et concentrer le nombre de plaquettes. Les plaquettes, qui ne sont plus dans le lit vasculaire, adhèrent à la structure sous-endothéliale. Sur la première couche de plaquettes, d'autres plaquettes vont s'agréger grâce aux interactions plaquettes / fibrinogène.
- ii) **La coagulation** : consolidation du premier thrombus grâce à la mise en place d'un réseau de fibrine permettant l'agrégation des globules rouges (thrombus rouge). Les cellules endothéliales, les monocytes et les fibroblastes sécrètent alors le facteur tissulaire (récepteur pour le facteur VII), élément majeur déclenchant la coagulation. Cette dernière correspond à une cascade de réactions enzymatiques permettant via l'activation de la thrombine, la transformation du fibrinogène (soluble) en fibrine (insoluble). Le réseau de fibrine ainsi formé va « séquestrer » les globules rouges et ainsi consolider le thrombus.

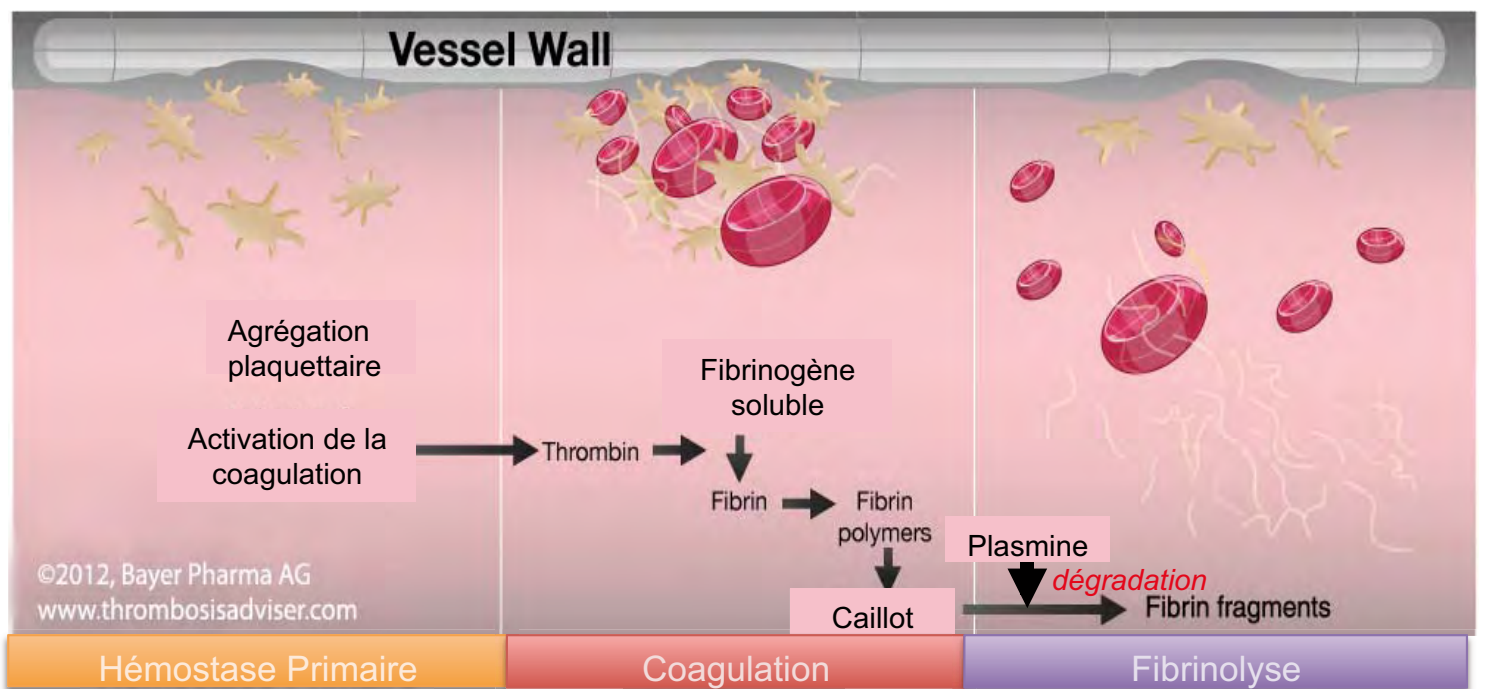


Figure 17 : L'hémostase, chez les vertébrés

- iii) **La fibrinolyse** : destruction des caillots. Pour ce faire, le plasminogène, qui circule sous forme inactive, va être activé par le tPA (tissu Plasminogen Activator, synthétisé par les cellules endothéliales) ou par l'uPA (urokinase Plasminogen Activator). Après activation au niveau du caillot, le plasminogène se transforme en plasmine, capable de dégrader le caillot de fibrine en produits de dégradation de la fibrine et en dimères et d'activer les métalloprotéases matricielles (MMP).

La résultante de cette hémostasie est une fermeture de la plaie permettant un arrêt du saignement. L'hémostasie permet aussi l'arrivée et le « guidage » des cellules immunitaires sur la zone de lésion et favorise leur adhésion à l'endothélium vasculaire <sup>124</sup>.

## *2. La réponse inflammatoire*

### *a) Généralités*

Après une lésion, la réaction inflammatoire est nécessaire afin d'éviter une infection pouvant conduire à la mort de l'organisme. Cette réaction inflammatoire est assurée par le système immunitaire. L'évolution de ce dernier, depuis près de 400 millions d'années, permet la survie des organismes vivants face aux attaques continues des milieux intérieurs et extérieurs <sup>125</sup>. On distingue deux types de systèmes immunitaires :

- i) **Le système immunitaire inné** : il est non spécifique et assure une réponse rapide. Ce système est la stratégie de défense la plus ancienne : il est activé indépendamment de l'agent pathogène. Ce système inné est dépendant de l'arrivée de cellules immunitaires appelées : neutrophiles, monocytes et macrophages et les cellules Natural Killer (NK). Ces cellules de l'immunité innée vont sécréter des médiateurs non spécifiques que l'on appelle interleukines et interférons (cytokines) et produire des Espèces Actives de l'Oxygène (EAOs). Dans un premier temps les molécules relarguées par les cellules immunitaires résidentes (médiateurs lipidiques : leucotriène B4 (LTB4) et/ou molécules chémo-attractantes (G-CSF)) entraînent la dilatation des vaisseaux sanguins, ainsi que leur perméabilité. Les granulocytes neutrophiles peuvent ainsi infiltrer le tissu lésé / infecté pour phagocyter les cellules lésées et les agents microbiens. Les macrophages arrivent sur la





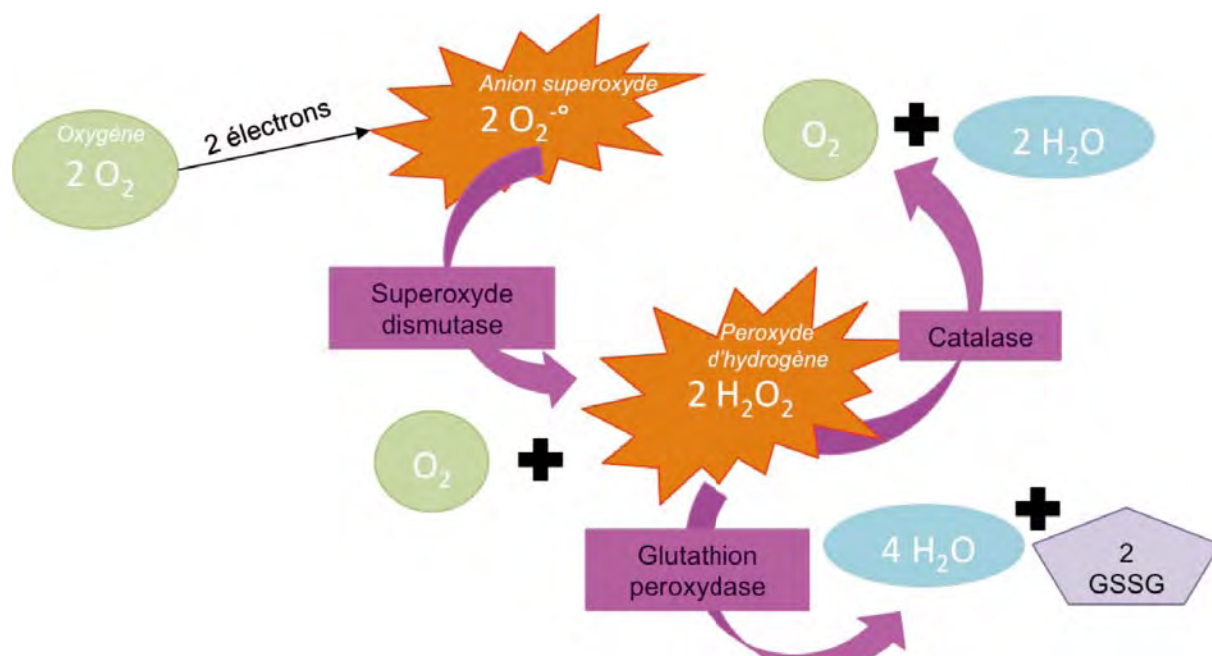
zone de lésion pour prendre le relais des neutrophiles et phagocyter les dernières cellules lésées et les agents microbiens. Les macrophages sécrètent également des cytokines pour activer la réaction immunitaire adaptative <sup>125</sup>.

- ii) **Le système immunitaire adaptatif** : il est spécifique. Les cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, cellules dendritiques) retournent dans les organes lymphoïdes (rate, ganglion, tissus lymphoïdes associés aux muqueuses) pour présenter les antigènes aux lymphocytes T. Les lymphocytes T (LT) vont alors sécréter des cytokines de type Th1 (pro-inflammatoires : IL-2, IFN- $\beta$ , TNF- $\beta$ ) ou Th2 (anti-inflammatoires : IL-4, IL-13, IL-8, IL-10, IL-14). Les LT Th2 activent les lymphocytes B (LB) *via* une interaction LT/LB. Les lymphocytes B vont alors proliférer de manière clonale et sécréter des anticorps spécifiques de l'antigène, permettant sa neutralisation. De plus l'expansion clonale, permet au système immunitaire adaptatif d'avoir une « mémoire » qui lui permet de réagir plus vite lorsque le même agent microbien réinfectera l'organisme <sup>125</sup>.

b) Production d'espèces actives de l'oxygène (EAOs) par les cellules immunitaires

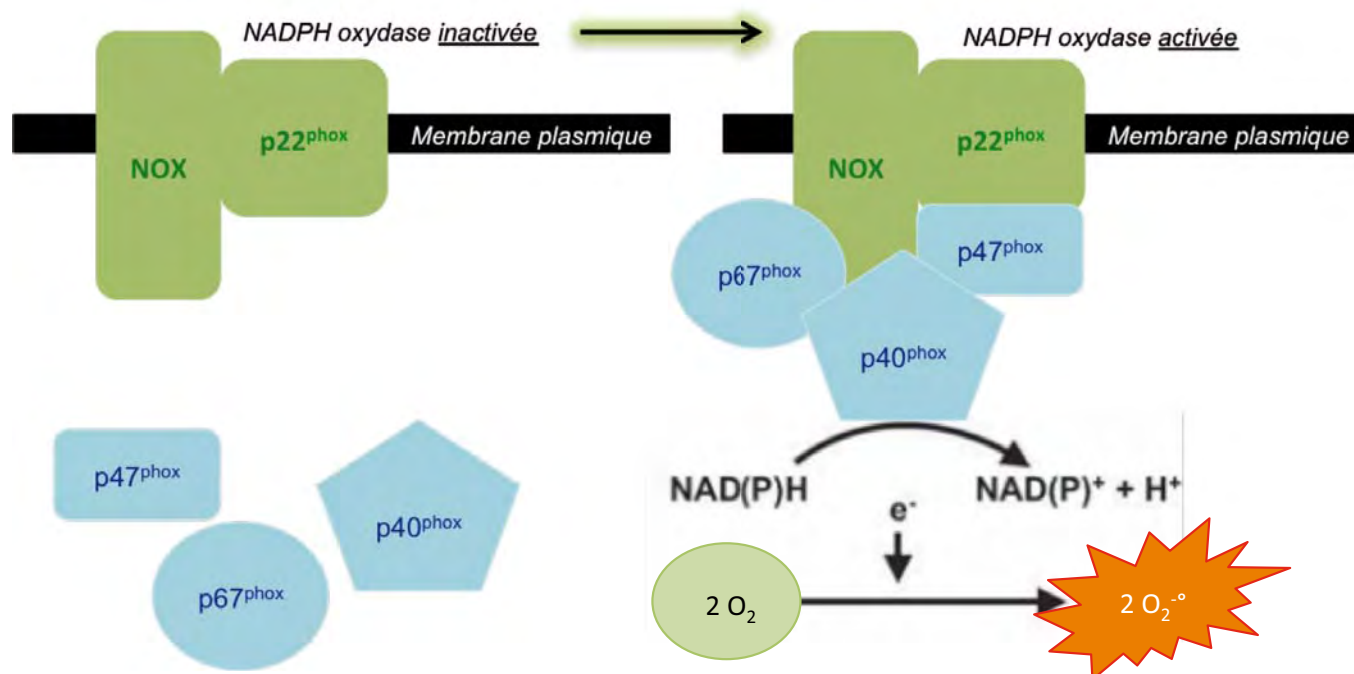
*Généralités sur les EAOs*

Si l'on utilise le mot ROS (Reactive Oxygen Species en anglais) dans le moteur de recherche d'articles scientifiques Pubmed, plus de 159 000 articles sont cités, le premier datant de 1945. De nombreux articles lient les EAOs à de nombreuses pathologies telles que le cancer, le diabète, les maladies cardio-vasculaires, ou à des états physiologiques tels que l'âge et le vieillissement. Cependant, les EAOs sont également impliquées dans des processus physiologiques qui sont indispensables à la survie de l'organisme (la défense immunitaire, défense antibactérienne, régulation du tonus vasculaire) ou comme messagers permettant la signalisation intracellulaire. Les EAOs peuvent donc être des i) molécules responsables du stress oxydant lorsque la production d'EAOs est très intense et maintenue dans le temps : cela entraîne un déséquilibre dans la balance pro- et anti-oxydante ; dans ce cas là, ces molécules sont délétères (oxydation lipidique, dommages irréversibles de l'ADN, oxydation protéique) conduisant à un vieillissement précoce et étant souvent à l'origine de développement de cancers <sup>126</sup>



**Figure 18 : Espèces réactives de l'oxygène et principales défenses anti-oxydantes enzymatiques**

- **Les superoxydes dismutases (SOD)** permettent l'élimination des anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et oxygène. Leur localisation est mitochondriale et cytoplasmique.
- **La glutathion peroxydase (GSHPx)** dans le cytosol ou dans les mitochondries, réduit le peroxyde d'hydrogène en utilisant le glutathion réduit (GSH) sur lequel elle transfère l'oxygène, formant ainsi du glutathion oxydé (GSSG). Sa localisation est extracellulaire,
- **La catalase**, qui contient du fer, réduit le peroxyde d'hydrogène en libérant de l'oxygène et de l'eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Sa localisation est cytoplasmique et dans les péroxysomes.



**Figure 19 : Production d'espèces réactives de l'oxygène par la NADPH oxydase**

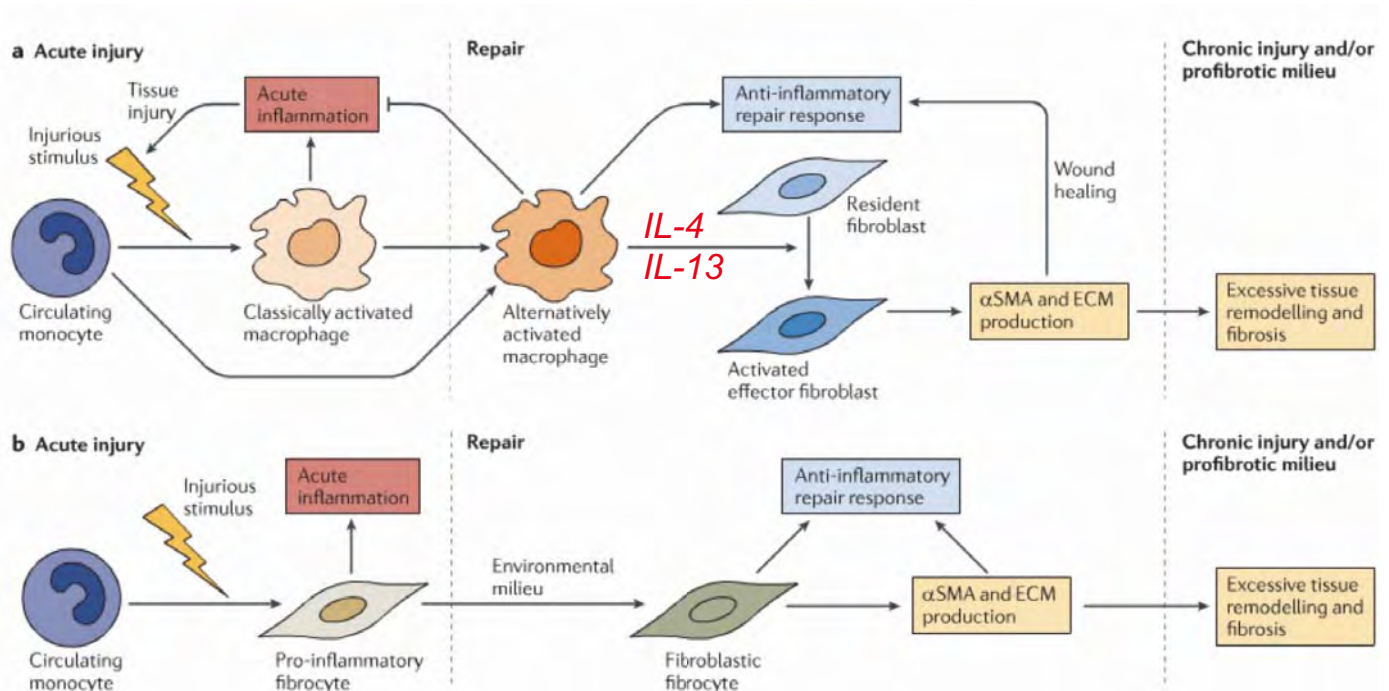
Dans un état non activé, les sous unités gp91<sup>phox</sup>(NOX) et p22<sup>phox</sup> sont à la membrane alors que les sous-unités p47<sup>phox</sup> p67<sup>phox</sup> et p49<sup>phox</sup> sont dans le cytosol.

La NADPH oxydase devient active par phosphorylation de la sous-unité p47, les sous-unités cytosoliques sont alors transloquées à la membrane. P47 est une protéine servant d'adaptateur permettant la translocation des autres sous-unités à la membrane et ne possède donc aucune activité catalytique alors que p67 est le cofacteur activateur essentiel. A partir de deux molécules d'oxygène ( $\text{O}_2$ ), production de deux molécules d'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ).

et ii) des molécules de signalisation : la production d'EOs est limitée en intensité et en quantité : cela entraîne une activation de nombreuses voies impliquées dans des processus de développement / de réactions immunitaires ou de régénération, permettant une adaptation de la cellule. Le rôle bénéfique ou délétère des EOs (selon leur intensité et leur durée) dépend de l'« activation des systèmes pro-oxydants » et « activation des systèmes anti-oxydants ». On distingue les systèmes antioxydants (*Fig. 18*) enzymatiques (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase) et non enzymatiques, parmi lesquels on classe les défenses i) exogènes (vitamine E, C,  $\beta$ -carotène, flavonoïdes) et ii) endogènes (ferritine, transferrine, acide urique, ubiquinone, céruloplasmine). L'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique sont capables de produire des EOs mais les deux principales sources de production d'EOs sont la mitochondrie et la membrane plasmique *via* l'activation de la NADPH oxydase. On dénombre plusieurs espèces réactives de l'oxygène : l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le monoxyde d'azote (NO), le peroxynitrite ( $ONOO^{\cdot}$ ). L'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont les EOs les plus connues comme étant fortement impliquées dans le stress oxydant (*Fig. 18*).

#### *Production des EOs par les cellules immunitaires*

Les premières cellules de l'immunité innée à intervenir et à coloniser la zone lésée ou infectée sont les granulocytes neutrophiles. Ces cellules sont spécialisées dans la phagocytose. En effet, elles phagocytent les cellules lésées ou agents infectieux. Cela est possible par la fixation des DAMPs (Damaged Associated Molecular Patterns) ) et/ou PAMPs (Pathogens Associated Molecular Patterns) sur les récepteurs TLR (toll like receptor) présents sur la membrane plasmique de ces cellules. En réponse, elles produisent des EOs *via* l'activation de la NADPH oxydase membranaire : on parle de burst oxydatif (très forte production d'EOs mais très brève). L'anion superoxyde est le premier dérivé de l'oxygène produit par la NADPH oxydase des neutrophiles (*Fig. 19*). La myéloperoxydase, contenue dans les granules azurophiles, transformera l' $H_2O_2$  en acide hypochloreux (HOCl) très toxique qui nettoiera la zone lésée / infectée. Finalement, ce burst entraîne aussi la mort des neutrophiles qui seront ensuite phagocytés par les macrophages. Dans un second temps, les macrophages M1 produiront également des EOs grâce à l'activation de



**Figure 20 : Recrutement des fibroblastes / fibrocytes dans la réparation tissulaire et le remodelage tissulaire**

a) Le modèle ancien propose, qu'en réponse à une lésion tissulaire, les macrophages activés infiltrer le tissu lésé. Ils produisent alors des cytokines (IL-4, IL-13) et activent des fibroblastes en myofibroblastes, qui se mettent alors à sécréter de la MEC.

b) Le modèle plus récent propose l'existence d'une cellule chimère entre macrophage et fibroblaste: le fibrocyte. Les monocytes provenant de la moelle osseuse vont migrer vers la zone de lésion et se différencier en fibrocytes. Ils participent alors, avec les macrophages, à la réponse inflammatoire tout en modulant leur phénotype sécrétoire. Ainsi, ces cellules auraient un rôle primordial dans le remodelage tissulaire.

De Reilkoff, 2011

la NO synthase inductible. Cette étape est très importante pour le reste de la réponse inflammatoire, comme nous le verrons plus tard (*cf paragraphe I, B, 2, d*). La NADPH oxydase est la machinerie de production d'EAOs la plus efficace chez les neutrophiles et les macrophages.

#### c) Phase pro-inflammatoire

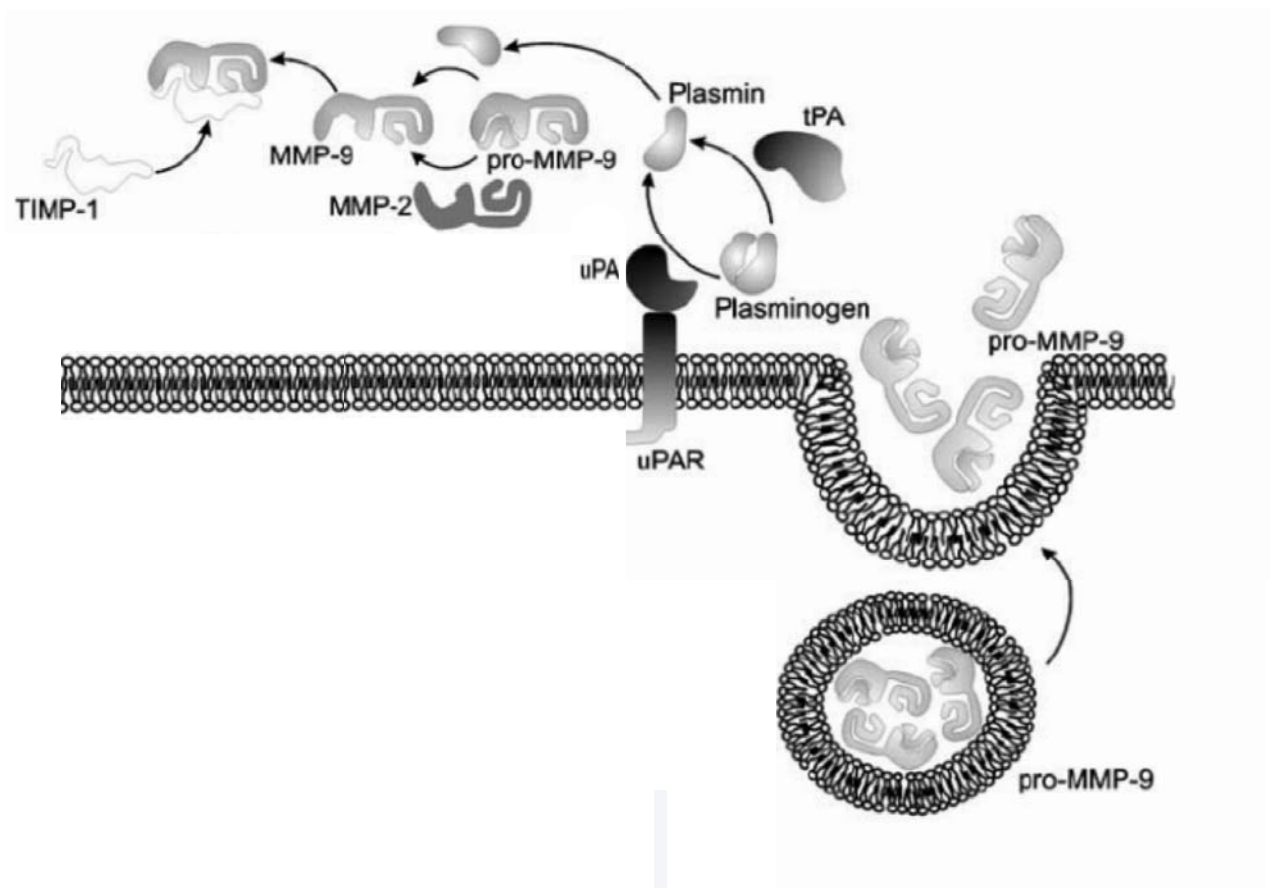
Après la phase d'hémostase et l'arrivée rapide des neutrophiles, les macrophages, résidents et circulants, sont recrutés vers la zone lésée par des cytokines / chimiokines comme MCP-1 (Monocytes Chemoattractant Protein 1) ou MIP-2 (Macrophages Inflammatory Protein -2). Les macrophages de type M1 (pro-inflammatoires) vont éliminer de la zone lésée, par phagocytose, les débris tissulaires et cellulaires. Ces macrophages vont alors entretenir la réaction inflammatoire en sécrétant à leur tour des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ). Ces cytokines pourront alors agir sur la prolifération des cellules épithéliales : il a été montré que l'absence d'IL-6 retarde la prolifération des kératinocytes basaux<sup>127</sup>, entraînant ainsi une cicatrisation très lente<sup>128</sup>.

#### d) Phase anti-inflammatoire

Après la phagocytose des corps apoptotiques des neutrophiles (efferocytose) par les macrophages, la polarité de ces derniers va changer : d'un phénotype M1, ils deviennent M2. Ils sécrètent alors des cytokines anti-inflammatoires ou Th2<sup>129</sup>. Les cellules de l'immunité adaptative, les lymphocytes T interviennent également en sécrétant de l'IL-4 et de l'IL-13 afin d'inhiber tous les signaux pro-inflammatoires mis en place auparavant. Ces deux cytokines participent au changement de polarisation des macrophages. Cette phase va permettre la mise en place du tissu de granulation et oriente le remodelage tissulaire en faveur d'une cicatrisation<sup>129</sup>.

### 3. *Mise en place du tissu de granulation*

La sécrétion de facteurs pro-angiogéniques (VEGF) et de facteurs de croissance (FGF ou PDGF) permet la mise en place du tissu de granulation, qui est un tissu très vascularisé contenant un grand nombre de fibrocytes et de fibroblastes<sup>130</sup>. Les fibrocytes sont des cellules mésenchymateuses qui dérivent de précurseurs fibroblastiques monocytaires issus de la moelle osseuse<sup>131,132</sup> (*Fig. 20*). Ils migrent jusqu'à la zone lésée et se différencient. Leur rôle est d'activer la



**Figure 21 : Représentation schématique de l'activation de MMP-9**

La forme zymotique de MMP-9 (pro-MMP-9) est sécrétée par exocytose. Après une cascade protéolytique pouvant être activée par la production d'EAOs, MMP-2 ou par le clou plaquettaire (uPA/uPAR (urokinase activator), plasmin), la pro-MMP-9 est transformée en forme active. MMP-9 est rapidement inactivée par son inhibiteur TIMP-1 (Tissue Inhibitor of MMP)

*De Michaluk, 2007*

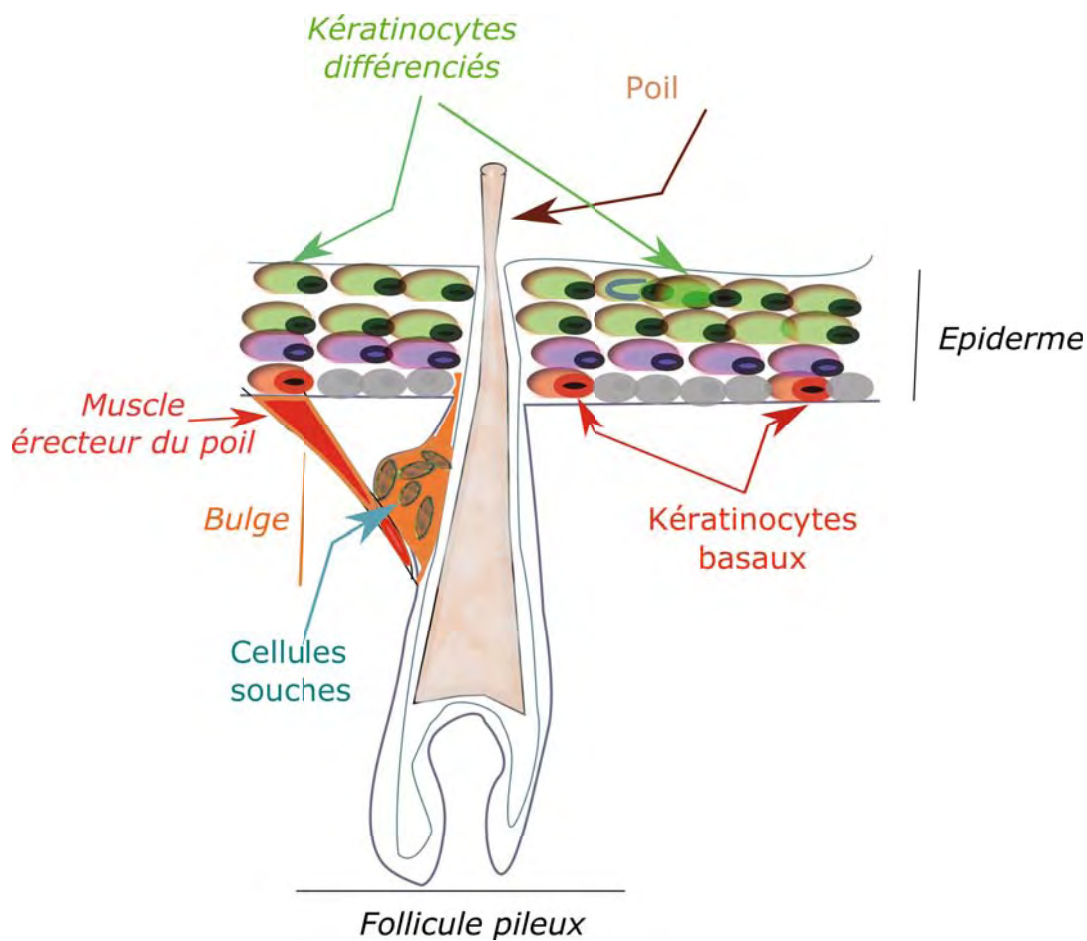
différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, mais également de sécréter des cytokines inflammatoires afin de maintenir un environnement inflammatoire. Les fibroblastes, comme les mastocytes et les cellules épithéliales, sont également capables de sécréter de l'IL-4 et de l'IL-13<sup>129,133</sup>.

Les macrophages de type 2 sécrètent alors du TGF- $\beta$ 1 qui lui, permet d'activer les myofibroblastes<sup>134,135</sup>. Une fois activés, ceux-ci vont sécréter la MEC, plus particulièrement le collagène de type I et de « se contracter », ce qui va permettre de rapprocher les deux berges de la plaie pour fermer la zone lésée. En parallèle, les macrophages sécrètent également TIMP-1 (inhibiteur des MMP-9), ayant pour conséquence une inhibition de la dégradation de la MEC et donc la mise en place progressive d'une fibrose.

#### 4. Remodelage tissulaire

Les myofibroblastes contractiles interagissent directement avec les kératinocytes basaux pour induire leur prolifération, leur différenciation *via* des contacts cellules-cellules, puis leur migration<sup>132</sup>. Après activation des kératinocytes basaux et production d'une grande quantité de MEC (qui permettra de combler la zone de lésion), les myofibroblastes rentrent en apoptose, tout comme les cellules endothéliales et les macrophages. Les corps apoptotiques sont alors phagocytés par les macrophages de type M2. Se met alors en place un remodelage qui fait intervenir les MMPs et leurs inhibiteurs (TIMPs), permettant de réarranger la MEC sécrétée en abondance par les myofibroblastes. Les MMPs (au nombre de 24 chez l'homme) sont constituées de 3 domaines conservés : un pré-domaine permettant l'acheminement de la protéine à la surface cellulaire, un pro-domaine et le groupement catalytique. L'activation des MMPs est expliquée dans la *figure 21*. Les TIMPs peuvent se fixer à ce dernier et inhiber l'activité des MMPs. Les MMPs peuvent être classées selon i) le type de matrice qu'elles dégradent (collagénase, gellatinase, stromélysines et matrilysines) ou ii) leur localisation (membranaire, sécrétée). Les MMPs peuvent être synthétisées par les cellules immunitaires (lymphocytes, macrophages, neutrophiles), les cellules endothéliales ou les fibroblastes suite à des stimuli cytokiniques ou mécaniques.

L'activation des TIMPs entraîne la formation d'une matrice sans cellule que l'on appelle communément « cicatrice ». Jamais la peau de la partie lésée puis cicatrisée ne retrouvera les fonctions de la peau non lésée<sup>136</sup>. Ainsi, le rapport



**Figure 22: Les cellules souches de la peau**

Les cellules souches du « bulge » sont multipotentes et résident de manière permanente dans le follicule pileux et interviennent dans la cicatrisation en donnant des cellules épithéliales indispensables à la cicatrisation. L'activité de ces cellules souches est contrôlée par l'innervation.

Les cellules souches interfolliculaires (kératinocytes basaux) sont présentes au niveau de l'assise cellulaire la plus profonde de l'épiderme et interviennent dans la cicatrisation en donnant des kératinocytes.

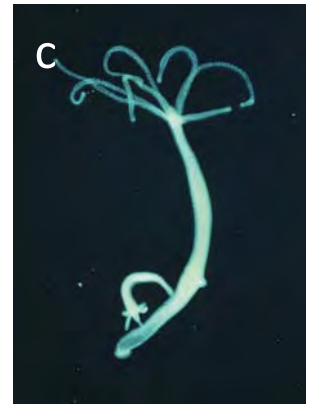


MMP/TIMP est très souvent utilisé pour mesurer l'efficacité des MMP et constitue un facteur de prédiction d'une bonne régénération <sup>137</sup>. Ainsi une trop forte activité des MMP9-2 associée à une activité faible des TIMP serait prédictif d'un ulcère alors que l'inverse serait prédictif d'une fibrose <sup>137</sup>.

Pourquoi les métalloprotéases matricielles sont-elles si importantes ? Comme nous l'avons expliqué plus haut, lors des processus de réparation tissulaire, se mettent en place une forte angiogenèse ainsi qu'un tissu de granulation. L'ensemble de ces processus est dépendant de l'action coordonnée des enzymes à activité protéolytique, dont font parties les MMPs. Il a justement été montré que ces MMPs jouent un rôle important dans la décomposition de la matrice provisoire formée après lésion<sup>138</sup>. Cela facilite ainsi la migration des kératinocytes (pour la peau) et des fibroblastes. Ce remodelage tissulaire MMP-dépendant est indispensable à la régénération chez le planaire<sup>139</sup>, la salamandre<sup>140,141</sup> et l'axolotl<sup>142</sup>. De plus, on sait que les MMPs peuvent voir leur activité induite par une augmentation locale de la quantité d'EOs, comme cela est le cas dès les premières heures post-lésion chez le poisson-zèbre ou la salamandre <sup>143,144</sup>.

### **C. Cicatrisation et cellules souches**

Il a été montré qu'au cours de la cicatrisation de la peau, le renouvellement de l'épiderme se faisait par émergence de nouveaux kératinocytes qui migrent vers la zone de lésion (*Fig. 22*). Les kératinocytes basaux sont capables de proliférer puis de migrer pour assurer la ré-épithélisation mais la voie la plus utilisée est la prolifération puis la différenciation de cellules souches. Chaque tissu / organe possède son stock de cellules souches, comme c'est le cas dans l'intestin, assurant un renouvellement physiologique constant et rapide de cet épithélium. Les cellules souches de la peau sont localisées dans le follicule pileux, dans une niche appelée « bulge » <sup>145,146</sup>. Ainsi, après une lésion, les cellules souches du bulge, vont proliférer, migrer puis acquérir un phénotype épithélial permettant une cicatrisation rapide <sup>147</sup>. Par ailleurs, il a été montré que le devenir de ces cellules souches était dépendant de l'innervation, *via* une sécrétion nerveuse de Shh <sup>148</sup>. En effet, la dénervation du bulge avant lésion cutanée, inhibe la prolifération des cellules souches épithéliales et retarde la cicatrisation cutanée<sup>148</sup> (*Fig. 22*).



**Figure 23 : Les différents organismes dotés de la capacité à régénérer**

- a) Axolotl
- b) Salamandre
- c) Hydre
- d) Poisson zèbre
- e) Xenopus
- f) Ver planaire
- g) Concombre de mer
- h) Oursin

Lors de la cicatrisation, sont donc impliqués les processus de l'hémostase, l'inflammation, le remodelage de la MEC, la présence de cellules souches et l'innervation.

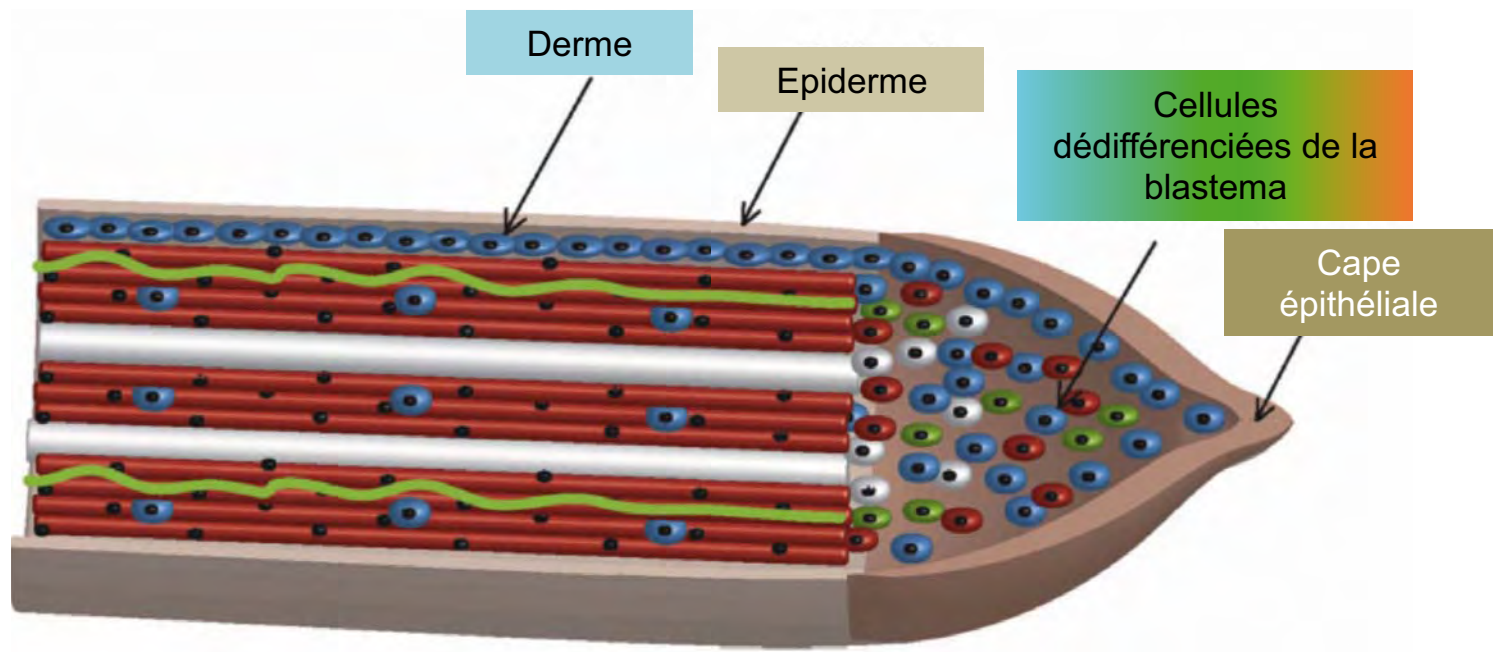
*Nous venons de voir que les mammifères adultes, après lésion, mettent en place une réparation tissulaire rapide, puisque la fermeture de la plaie est effective au bout de 48 h environ. Cette cicatrisation est dépendante de l'hémostase, d'une phase pro-inflammatoire suivie d'une phase anti-inflammatoire toutes les deux finement régulées dans le temps, avec la mise en place d'un tissu de granulation puis d'un remodelage de la MEC. Cette cicatrisation est possible par la présence de cellules souches au sein du tissu lésé.*

*Voyons à présent, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la régénération.*

## **II. Réparation tissulaire : régénération chez les vertébrés inférieurs, poissons et les planaires**

Les principaux organismes utilisés pour étudier les mécanismes de régénération sont par ordre de complexité l'hydre, le vers planaire, la salamandre et le poisson zèbre (*Fig. 23*). De manière plus anecdotique, la régénération chez l'Holothurie (concombre de mer) et l'oursin est également étudiée.

Comme la cicatrisation, la régénération est dépendante de l'activation d'une succession d'étapes coordonnées dans le temps et l'espace : i) activation de cellules immunitaires, ii) formation de la cape épithéliale ii) production d'EOs iv) apoptose et prolifération cellulaire permettant un renouvellement coordonné de nombreux types cellulaires, v) remodelage de la matrice extra cellulaire vi) formation d'une blastema et vii) différenciation cellulaire. Après la succession de ces étapes, l'activation de différentes voies de signalisation (Wnt, EGF-EGFR, ...) entraîne une certaine plasticité des cellules différenciées, *in vivo*, de même que le maintien d'une



**Figure 24 : Formation de la blastema chez la salamandre.**

- Après amputation, il y a formation de la cape épithéliale par les kératinocytes qui migrent pour fermer la zone amputée. Les cellules de la cape épithéliale envoient des signaux aux cellules différenciées, qui vont se dé-différencier, migrer puis proliférer.
- Ces cellules dé-différenciées forment une réserve de cellules aux capacités de cellules stromales mésenchymateuses qui vont se re-différencier dans leur lignage d'origine. Ces cellules ont donc une différenciation restreinte. Ainsi, les cellules vont se différencier pour former un membre à savoir des cellules osseuses (blanc), le derme et tissu conjonctif (bleu), cellules musculaires (muscle), en cellule nerveuse (vert).

*Adapté de Murawala, 2012*

identité dite de position, élément essentiel pour que la régénération du tissu se fasse correctement.

Aujourd'hui, il est certain que chacune des étapes énoncées précédemment est nécessaire et indispensable à la régénération puisque l'inhibition de chacune de ces étapes, indépendamment, inhibe la régénération.

### **A. Hémostase**

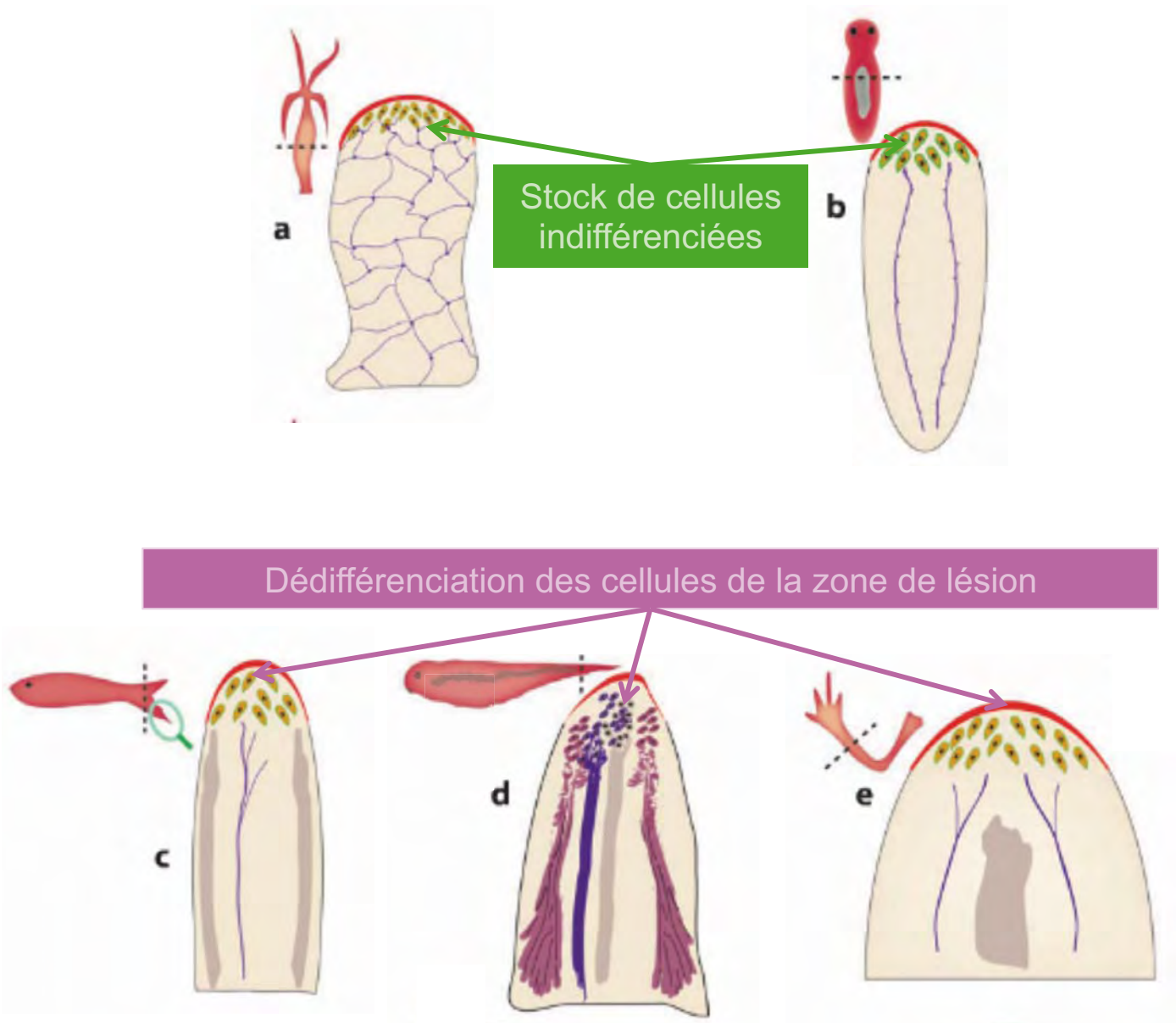
Avant la mise en place de la blastema, il est indispensable, comme c'est le cas chez le mammifère, que l'hémostase ait lieu. Tanaka et coll ont montré, chez la salamandre, que la ré-entrée des myotubes (caractéristiques des vertébrés inférieurs) dans le cycle cellulaire, était stimulée par un facteur du sérum, activé par la thrombine <sup>149</sup>. Cette ré-entrée des myotubes dans le cycle cellulaire est indispensable à la régénération du membre. Ces auteurs ont également mis en évidence *in vitro* que les myotubes de mammifères ne répondent pas au facteur du sérum activé par la thrombine. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse que cette différence de réponse chez les vertébrés inférieurs et chez les mammifères pouvait, en partie expliquer, les différences de réparation tissulaire <sup>149</sup>.

### **B. Mise en place de la cape épithéliale**

Après l'étape d'hémostase il est important de noter que chez les amphibiens se forme une cicatrice temporaire qui permet de fermer la zone amputée <sup>150</sup>. Cette cicatrice est nommée cape épithéliale (*Fig. 24*). Elle est formée par la prolifération et la migration des cellules épithéliales (kératinocytes) présentes à proximité de la zone de lésion. Durant cette étape, les cellules présentes sur la zone de lésion sécrètent des protéines essentielles à la fermeture de la zone lésée telles que la laminine et le collagène de type IV afin d'éviter toute infection <sup>150</sup>.

Les cellules de la cape sécrètent alors :

- i) un ou des ligands de la voie FGF, qui vont activer la voie Wnt5 et permettre de maintenir les cellules sous jacentes à la cape épithéliale dans un état indifférencié <sup>151,152,153,154</sup>. Cette structure bourgeonnante composée de cellules immatures est appelée « blastema ». Il a été montré que l'inhibition de la voie FGF bloque la formation de la blastema chez le poisson zèbre <sup>155</sup>. Si la voie FGF est impliquée dans de nombreux dialogues entre épiderme et



**Figure 25 : La blastema des différents organismes capables de régénérer**

**a) Hydre** : régénération de la tête 36 h après amputation

**b) Ver Planaire** : régénération possible grâce aux néoblastes (cellules souches) présentes, même chez l'adulte. Ces cellules migrent vers la zone de lésion pour former « la blastema »

**c) Poisson zèbre** : régénération de la nageoire du poisson (c), composée de plusieurs tissus « ray », vaisseaux, fibres nerveuses.

**d) Xénope à l'état de têtard**: la queue du xénope régénère grâce à différents types de progéniteurs qui se diviseront dans le « moignon » pour former la moelle épinière (violet), le muscle (rouge) et la notochorde (beige)

**e) Salamandre** : après amputation, le membre amputé présente une blastema, structure colonisée par des cellules dédifférenciées. La présence de l'innervation (violet) est indispensable pour une régénération.

*Adapté de Brockes et Kumar, 2009*



mésenchyme, ses cibles dans le processus de régénération sont encore mal connues. L'interaction entre les cellules de la blastema et les cellules de la cape épithéliale est indispensable pour que le bourgeonnement continue. En effet, si on recouvre la blastema par un lambeau de peau mature, la régénération est bloquée <sup>155</sup>.

- ii) des MMPs qui vont dégrader localement la MEC <sup>141,156</sup>. L'expression de ces MMPs est très précoce (2 h après amputation). Cette dégradation de la MEC est indispensable à i) la dédifférenciation des cellules puis ii) favorisera la migration de cellules immatures (fibroblastes) et cellules matures dédifférenciées (cellules musculaires, ostéoblastes, cellules de Schwann, etc...), qui participent à la formation de la blastema.

### **C. Formation de la blastema**

Comme nous venons de le voir, après lésion chez les animaux dotés de la capacité de régénération, la blastema qui composée de cellules immatures se met en place sous la cape épithéliale (*Fig. 24, 25*). Cette structure est indispensable à la régénération : en effet si on bloque sa formation, la régénération n'a pas lieu <sup>151</sup>. Nous allons donc décrire les mécanismes impliqués dans la formation de la blastema.

La blastema se forme à partir i) de cellules indifférenciées présentes sur le site de lésion (invertébrés) ou ii) d'une dédifférenciation de cellules matures (vertébrés inférieurs) <sup>157-159</sup>.

#### *1. Les différentes sources cellulaires de la blastema*

##### *a. La dédifférenciation de cellules matures : étude de la blastema chez la salamandre*

Ces cellules dédifférenciées, qui forment la blastema, ont des capacités similaires à celles des cellules souches. Après avoir migré au niveau de la zone lésée, ces cellules prolifèrent et forment alors un amas de cellules multipotentes (c'est-à-dire capables de donner toutes les cellules différenciées appartenant aux feuilletés mésodermique, ectodermique et endodermique), responsables de la formation du bourgeon, à partir duquel se reformera la partie manquante du membre.





Une fois la blastema formée, des étapes de différenciation proximo-distale vont permettre la régénération du membre amputé. Alors que les cellules dédifférenciées de la blastema sont qualifiées de cellules souches, il est assez surprenant de constater que leur différenciation est majoritairement restreinte à leur origine développementale <sup>160</sup>. Ainsi, dans la plupart du temps, une cellule musculaire dédifférenciée se différenciera exclusivement en cellule musculaire dans le nouveau membre régénéré <sup>160</sup>.

b. La blastema issue de stock de cellules indifférenciées : cas du planaire et de l'hydre

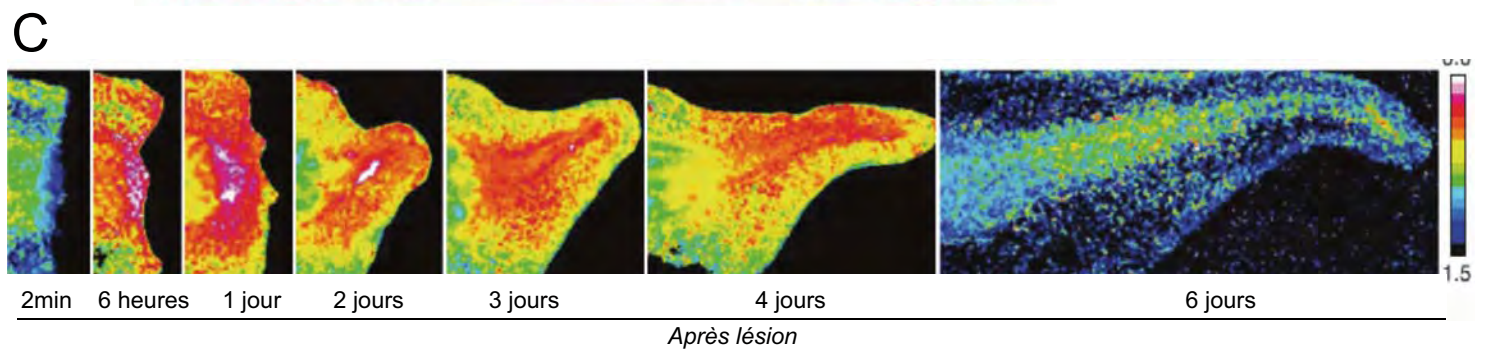
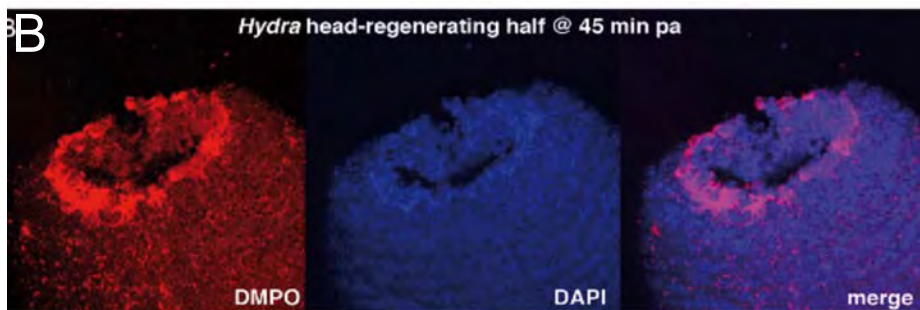
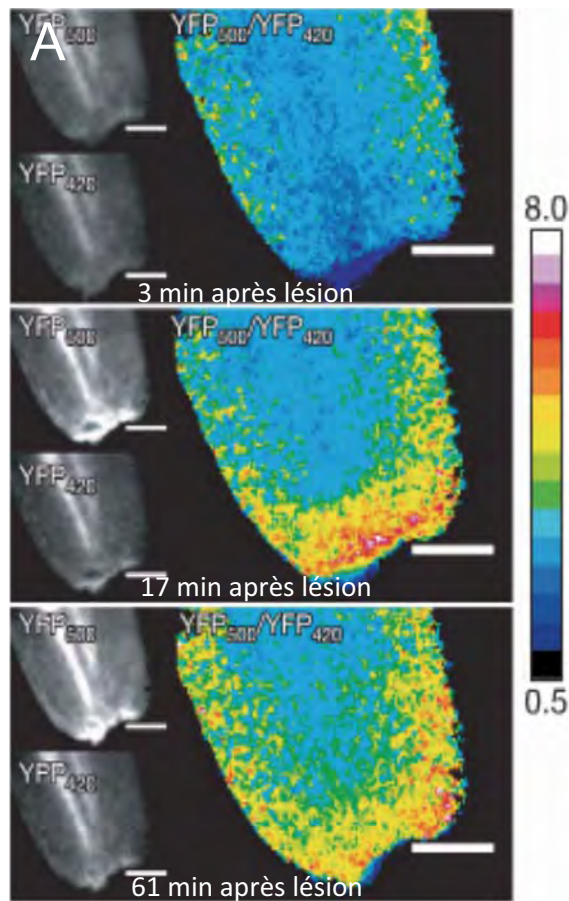
Chez l'hydre ou le planaire, par exemple, les cellules de la blastema sont issues de la prolifération d'un stock de cellules souches préexistantes chez l'individu (les néoblastes ou cellules progénitrices interstitielles) (*Fig. 25*) <sup>158,159</sup>.

Un article rapporte que chez un vertébré inférieur, la blastema peut également provenir d'un stock de cellules « souches ». En effet, il a été montré que chez *Ambystoma mexicanum* la régénération est possible par une prolifération de cellules souches satellites Pax7+ <sup>161</sup>, alors que chez *Notophthalmus viridescens*, la blastema résulte d'une dédifférenciation des cellules musculaires après lésion.

2. *La blastema : structure essentielle redondante et autonome*

De manière très étonnante, des études de greffes ectopiques montrent qu'après amputation d'un membre, si la blastema est prélevée puis greffée sur une partie saine du corps de la salamandre, un membre repoussera sur cette partie saine du corps <sup>162</sup>. Étrangement, la blastema se suffit à elle-même, puisque si cette même blastema est prélevée puis mise dans une boîte de culture, une patte se développera dans cette boîte de culture.

La mise en place de la blastema est donc d'une importance cruciale : on pourrait parler de structure autonome de régénération. Au regard de son importance, c'est sûrement pour cette raison qu'il existe plusieurs sources de cellules possibles en fonction des espèces : cellules indifférenciées ou cellules dé-différenciées. On pourrait même imaginer que ces deux types de cellules puissent exister chez un même animal, pour une régénération plus « efficace ».



**Figure 26 : Différentes répartitions de production d'EOs en fonction des espèces.**

Les cellules du moignon produisent les EAOs chez le poisson-zèbre adulte (A: *Niethammer, 2009*) et chez l'hydre (B: *Vriz et al, 2014*) alors que chez le têtard (C) la production d'espèces réactives de l'oxygène est plus disparate (D: *Love et al. 2013*).

## **D. La production d'espèces réactives de l'oxygène (EAOs) : une signalisation « carrefour » de la régénération**

### *1. L'importance des EAOs au cours de la régénération*

L'implication des EAOs au cours des processus de régénération chez les vertébrés inférieurs est aujourd'hui indéniable. En effet, il a été montré qu'après amputation de la queue, chez le poisson zèbre, les cellules épithéliales produisaient de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  <sup>163</sup>. Cet  $\text{H}_2\text{O}_2$  n'est pas réparti de manière homogène mais en gradient de concentration et les cellules immunitaires vont migrer vers la zone la plus concentrée en EAOs. La production des EAOs et le recrutement de leucocytes sont régulés dans le temps et dans l'espace au cours des processus de régénération <sup>163</sup>. De plus, la répartition des EAOs n'est pas la même en fonction des espèces étudiées. En effet, la production d'EAOs est limitée à la zone de lésion chez le poisson zèbre adulte <sup>163,164</sup> ainsi que chez l'hydre alors que chez le têtard, cette production d'EAOs est plus diffus dans l'organisme <sup>165</sup> (*Fig. 26*). Etant donné que ces trois espèces d'animaux régénèrent, on peut penser que la production d'EAOs est indispensable à la régénération mais que leur localisation n'est pas un facteur déterminant.

Love et coll confirment la présence indispensable des EAOs au cours des processus de régénération en 2012. En effet, chez le poisson zèbre, après amputation de la queue, l'utilisation de l'apocynine (inhibiteur de la NADPH oxydase et son interaction avec les sous unités p91 phox / p22), inhibe la régénération <sup>165</sup>. Alors que l'on aurait pu s'attendre à une production d'EAOs par les neutrophiles et les macrophages chez le poisson zèbre lésé, Love et coll ont montré que cette production locale d'EAOs est indépendante des cellules immunitaires recrutées puisque ces dernières n'arrivent sur le site de lésion que 2h après la lésion alors que la production d'EAOs est mesurable quelques minutes seulement après la lésion <sup>165</sup>. D'après les auteurs, il est donc très probable que les cellules présentes sur la zone de lésion (cellules épithéliales) soient à l'origine de ce signal fortement oxydatif. Cependant, cette étude ne prend pas en compte le fait que la grande majorité des tissus possède un stock de cellules immunitaires résidentes qui pourraient produire des EAOs en réponse à une lésion. Andreas Bergmann (congrès « Molecular and Cellular mechanisms of regeneration », Keystone, Janvier 2016, données non publiées) propose en fait que la production d'EAOs par les premières cellules



« lésées » activerait la voie Jun Kinase (JNK). Cette activation entraînerait une modification d'activité des macrophages résidents qui deviendraient pro-inflammatoires et produiraient alors une grande quantité d'EOs. Ces macrophages activés, sécrèteraient aussi des molécules telles que le TNF- $\alpha$  (cytokine inflammatoire également impliquée dans l'activation de la voie JNK). La production d'EOs serait ainsi rapidement amplifiée.





D'autres cellules pourraient être impliquées dans la production d'EOs, notamment les cellules de Schwann. En effet, très récemment, il a été montré, chez le poisson zèbre, que les cellules de Schwann produisent des EOs, *via* une signalisation Sonic Hedgehog (Shh). Ainsi, la suppression de ces cellules sur la zone de lésion, inhibe à la fois la production d'EOs et la régénération de la nageoire (Sophie Vriza, congrès « Molecular and Cellular mechanisms of regeneration, Keystone, Janvier 2016, données non publiées). Ces données sont très cohérentes avec l'implication des cellules nerveuses et la mise en place de la blastema que nous discuterons ultérieurement.

## *2. La production d'EOs permet la ré-innervation*

Les EOs n'ont pas comme seule vocation d'attirer les cellules immunitaires. En effet, Rieger et coll ont montré que la production d'EOs post amputation de la queue chez le poisson-zèbre de la nageoire caudale permettait une ré innervation sensorielle de la zone lésée <sup>166</sup>. En effet, l'amputation de la nageoire caudale d'un poisson dépourvu de système de production de EOs, ne présente pas de régénération, ni de ré-innervation. L'ajout local d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez ce poisson entraîne, une ré-innervation sensorielle fonctionnelle de la nageoire caudale, puis dans un second temps une innervation motrice puisque le poisson retrouve une mobilité de sa queue <sup>166</sup>. C'est uniquement parce que cette ré-innervation a lieu, que la régénération sera complète (comme nous le verrons dans le *paragraphe II, D*).

## *3. La production d'EOs est responsable des vagues d'apoptose et de prolifération cellulaire*

Plusieurs études sur la régénération tendent à montrer que la production d'EOs est nécessaire à l'apoptose des cellules présentes au niveau de la lésion <sup>167</sup>. L'inhibition de la production d'EOs, en plus d'inhiber la régénération de la nageoire

Espèce	Production d'EOs	Conséquences
 Poisson zèbre -Larve-	Instantanée	<div> <div>Attraction des leucocytes</div> <div>Ré innervation sensorielle</div> </div>
 Poisson zèbre -Adulte-	12/16h post lésion	<div> <div>Activation de la voie JNK</div> <div>Apoptose des cellules du moignon entre 15 et 18h</div> <div>Formation Blastema</div> </div>
 Hydre	45 min post lésion	<div> <div>Activation de la voie MAPK/CREB</div> <div>Mort cellulaire par apoptose</div> </div>
 Têtard	0h – 24h	<div> <div>Apoptose des cellules Produisant les EAOs {Tseng, 2007}</div> <div>Activation de la voie Wnt</div> <div>Prolifération cellulaire</div> <div>Repousse axiale</div> </div>

**Figure 27: Conséquences de la production d'EOs après lésion chez différentes espèces qui régénèrent**

caudale du poisson zèbre adulte, inhibe l'apoptose des cellules (majoritairement) épithéliales et mésenchymateuses<sup>164</sup>. Cette inhibition d'apoptose est associée à une inhibition de la prolifération des cellules épithéliales, et donc à une inhibition de la formation de la blastema (*Fig. 27*). L'ensemble de ces résultats indique que la production d'EAOs est indispensable à la régénération *via* le déclenchement d'une apoptose cellulaire massive. Par ailleurs, nous avons vu auparavant que cette apoptose massive était aussi indispensable, à la résolution du phénomène inflammatoire.

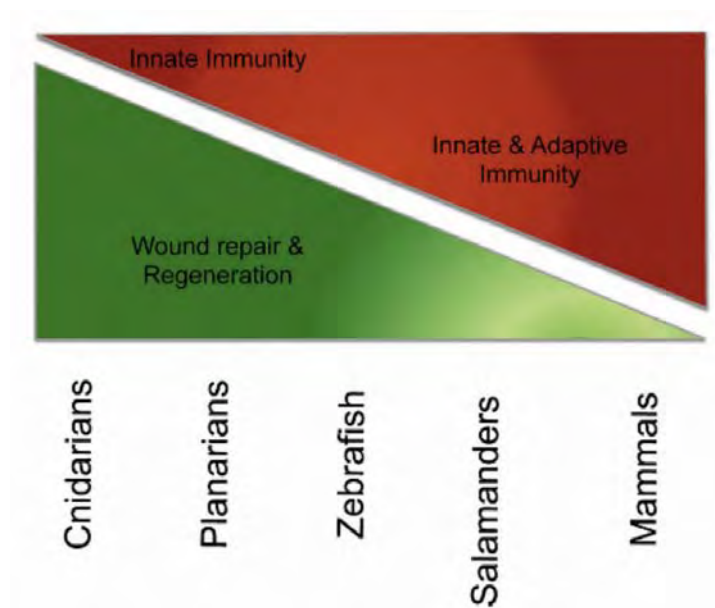
L'importance de la production massive d'EAOs a été décrite dans différents mécanismes cellulaires du développement embryonnaire : recrutement de cellules immunitaires, vagues d'apoptose suivies de vagues de prolifération cellulaire. Il n'est donc pas étonnant de retrouver ces EAOs au cours de la régénération, qui peut être, rappelons-le, assimilé à une organogénèse à l'état adulte.

## **E. La réponse inflammatoire au cours de la régénération**

Parmi les animaux qui régénèrent, certains sont dotés d'une immunité exclusivement innée (planarie) alors que d'autres possèdent une immunité innée et une immunité adaptative (salamandre, poisson zèbre)<sup>168</sup> (*Fig. 28*).

### *1. Immunité innée au cours de la régénération*

La présence de macrophages sur la zone de lésion après amputation est indispensable à la régénération du membre chez la salamandre<sup>169</sup>. En effet, Godwin et coll. ont montré que la déplétion en macrophages à l'aide du clodronate, après amputation, inhibait la régénération de la patte chez la salamandre. L'absence de précoce de macrophage sur la zone amputée inhibe la formation de la blastema alors que la déplétion tardive (après formation de la blastema) a pour conséquence la mise en place (plus lente) d'une patte « anormale » (plus petite, moins vascularisée)<sup>169</sup>. La déplétion de macrophages inhibe l'expression de MMP-9 par les cellules de la cape épithéliales mais aussi l'expression de TGF- $\beta$ , essentielle à la régénération<sup>170</sup>.



**Figure 28 : Corrélation inverse entre complexité du système immunitaire et capacité à régénérer**

*De Peiris, 2014*



## 2. Immunité adaptative au cours de la régénération

D'autres cellules de l'immunité sont impliquées dans les processus de régénération. Chez le xénope, la présence de lymphocytes T dit régulateurs est corrélée à une perte du potentiel de régénération <sup>171</sup>. Ainsi, l'apparition de ces cellules au cours de la métamorphose du xénope permet d'expliquer que le xénope ne puisse régénérer qu'au stade larvaire <sup>172</sup> (*Fig. 28*).

A l'inverse, la salamandre conserve sa capacité de régénération tout au long de sa vie <sup>173,174</sup>. Mais, à la différence du xénope, au cours de sa métamorphose le système immunitaire de la salamandre ne subit pas de modification drastique <sup>175</sup>. Nous avons vu que chez les vertébrés inférieurs, les cellules se dédifférencient pour la formation de la blastema. Ces cellules dédifférenciées - présentant des antigènes particuliers - ne devraient pas être acceptées par le système immunitaire adaptatif de la salamandre. Il est fort probable qu'évolution du système immunitaire adaptatif n'est pas « compatible » avec la mise en place d'une régénération. Ainsi, on peut se demander comment le système immunitaire adaptatif de la salamandre « accepte » ces cellules dédifférenciées, et ne les détruit pas.

Peut être qu'une partie de la réponse réside dans ces deux propositions :

- On peut penser que plus un animal est évolué, plus son système immunitaire adaptatif est performant et évolué. Ainsi le mammifère possède un système immunitaire bien moins permissif que celui de la salamandre. La salamandre, comme les autres vertébrés présente une réponse immunitaire dite « immunodéficiente » pour plusieurs raisons : la pulpe blanche et rouge ne sont pas compartimentalisées dans leur rate <sup>176</sup>, ces animaux présentent uniquement deux types d'Immunoglobulines (Ig) mais celles-ci ne jouent pas de rôle dans la réponse humorale (sécrétion d'anticorps), et il n'y a pas ou très peu de coopération entre les cellules immunitaires innées – et adaptatives (réponse humorale) <sup>172</sup>. Les mécanismes régulateurs qui permettent aux cellules dédifférenciées, (qui réacquièrent des antigènes embryonnaires dans un tissu adulte) d'être reconnues comme des cellules du soi par le système immunitaire de la salamandre ne sont pas connus. On peut ici, se demander si immunité et mise en place de la blastema à partir de cellules indifférenciées (planaire / hydre) ou de cellules dédifférenciées (salamandre) sont liées. Cependant, aujourd'hui aucune étude ne montre un lien



entre le système immunitaire adaptatif et la mise en place de la blastema (cellules souches ou dédifférenciation).

- Il a été montré que la salamandre, suite à une amputation du membre, présentait une diminution du nombre de lymphocytes jusqu'à que la régénération du membre soit complète. Ainsi, en plus d'avoir un système immunitaire adaptatif moins performant qu'un mammifère, les vertébrés inférieurs ont un nombre de cellules immunitaires adaptatives diminué après une lésion.

Pour conclure, on retiendra que le système immunitaire de la salamandre, bien que plus évolué que celui des planaires est bien moins puissant que celui des mammifères, ce qui pourrait expliquer, entre autre cette différence de capacité de régénération. La compréhension de l'implication exacte des systèmes immunitaires au cours de la régénération est probablement fondamentale pour comprendre pourquoi les mammifères ne sont pas capables de régénérer.

## **F. L'innervation et identité de position des cellules souches de la blastema**

### *1. Innervation au cours de la mise en place de la blastema*

Dès 1958, Charles Bodemer a montré l'importance de l'innervation dans les processus de régénération. Une lésion est faite sur une patte de salamandre puis les nerfs de cette même patte sont greffés au niveau du coude de la patte lésée. Il en résulte la repousse d'un membre au niveau du pli du coude<sup>177</sup>. En 1984, Brockes et coll ont montré que la dénervation du membre avant amputation, ne modifie pas la mise en place des cellules composant la blastema, mais inhibe la croissance et la division des cellules qui la composent<sup>178</sup>. En 2004, dans un modèle de régénération ectopique (greffe d'une blastema sur une partie du corps non lésée) chez la salamandre, il a été montré que l'innervation joue un rôle essentiel dans la mobilisation, la migration et la différenciation des cellules qui forment la blastema<sup>179</sup>. Dans cet article, les auteurs montrent que chaque étape est régulée temporellement par l'innervation. Si l'une des étapes est bloquée, la régénération est négativement impactée.

L'innervation permet donc d'envoyer des messages de position, indiquant où doit se mettre en place la blastema et à quelle taille doit repousser le membre<sup>177,180</sup>.



Il est important de noter que l'ensemble des expériences récentes sur le rôle de l'innervation dans les processus de régénération ne distingue pas les différents types d'innervation : innervation efférente somatique et autonome (sympathique, parasympathique) et innervation afférente sensorielle. Une seule étude remontant à 1950 montre que seule l'innervation sensorielle est nécessaire à la régénération<sup>181</sup>.

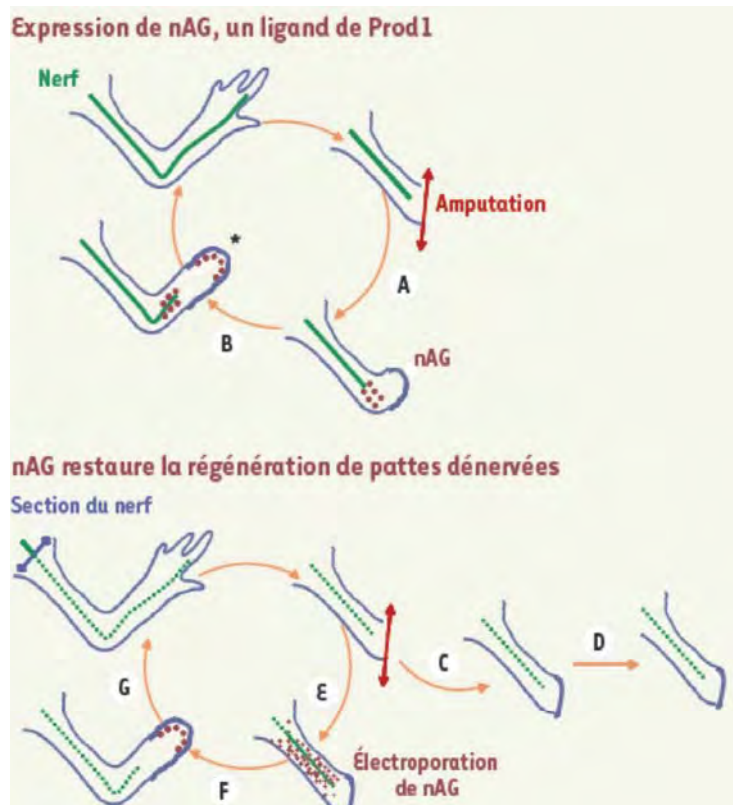
Ces données sont cohérentes avec le fait que l'innervation afférente soit la première innervation à être activée après lésion tissulaire pour mettre en alerte l'organisme de l'endroit et de l'importance de la lésion. Cette alerte peut ensuite activer un (ou plusieurs) arc réflexe impliquant l'innervation efférente somatique ou autonome sympathique / parasympathique.

## *2. Identification de différentes molécules / neuropeptides dans la mise en place de la blastema*

L'innervation peut jouer un rôle *via* différentes molécules / neuropeptides. Il a été montré que la sécrétion de substance P (neurotransmetteurs du système nerveux sensoriel)<sup>182</sup> ou du glial growth factor (GGF) est fortement augmentée après amputation du membre chez la salamandre<sup>183</sup>. L'activation de l'innervation peut également déclencher la synthèse du fibroblast growth factor (FGF) par les cellules de la cape épithéliales<sup>184</sup>. Kumar et coll montrent que l'importance de l'innervation dans les processus de régénération chez la salamandre passe par l'axe nAG (new Anterior Gradient 2 protein) / Prod 1 (ou CD59).

## *3. Cas particulier du couple nAG/ Prod1*

Au cours de la régénération chez la salamandre, nAG est produit dans un premier temps par les cellules de Schwann, 5 jours après l'amputation (lors de l'étape de dédifférenciation précoce) puis par les cellules de la cape épithéliale de la blastema, 12 jours post-amputation (lors de l'étape de bourgeonnement précoce). Les cellules de Schwann sont des cellules gliales périphériques pouvant être i) myélinisantes (leur rôle est d'isoler les fibres nerveuses pour favoriser le passage de l'influx nerveux) ou ii) non myélinisantes. Après dénervation, aucune production de nAG n'est retrouvée (ni même au niveau de la cape épithéliale) et l'apport extérieur de nAG dans le membre amputé après dénervation est suffisant pour restaurer la régénération complète de la patte<sup>185</sup> (*Fig. 29*). nAG, en se fixant à Prod-1 (glycoprotéine attachée à la membrane par une ancre GPI (glycosyl-phosphatidyl-



**Figure 29 : Importance de la libération de nAG pour la régénération de la pête chez la salamandre**

Dans un premier temps, nAG (petite protéine de 27 kDa) est sécrétée par les cellules de Schwann, présentes dans le moignon. Ce sont ensuite les cellules de la cape épithéliale qui produiront nAG.  
 nAG : newt anterior gradient, ligand de Prod1

inositol) portée par les cellules de la blastema) augmenterait la prolifération cellulaire mais interviendrait également dans l'organisation spatiale de la nouvelle patte régénérée. Récemment, il a également été montré *in vitro* que l'activation de Prod-1 sur des cellules mésenchymateuses issues de blastema de triton augmente l'expression de MMP-9, acteur précoce de la régénération, connu pour dégrader la MEC, permettant ainsi entre autres, de faciliter la migration cellulaire. Cet effet sur la transcription de MMP9 est médié par l'interaction de Prod1 avec EGFR (Epidermal growth factor receptor) qui active la voie de signalisation MAPk/ERK<sup>186</sup>. Ces données sont cohérentes avec des données obtenues chez le cricet chez qui la régénération du tarse est aussi dépendante de l'activation d'EGFR. Celui-ci diminue l'activation de la voie de signalisation Wnt et régule également l'expression de gènes impliqués dans la mise en place de l'axe proximo-distal durant la régénération<sup>187</sup>. L'innervation est donc indispensable pour définir l'identité de position des cellules souches présentes dans la blastema. L'identité de position est cruciale et permet à la partie distale régénérée d'être identique à la partie préalablement amputée.

L'implication de l'innervation est avérée dans les processus de régénération au sein de toutes les espèces. En plus des modèles précédemment décrits, son implication a été démontrée dans le cas de la régénération de la nageoire du poisson-zèbre<sup>188</sup>, du ver planaire<sup>189</sup> ou encore de l'hydre<sup>190</sup>.

L'équivalent de nAG chez le xenope (XAG2) est impliqué dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur au cours de l'embryogénèse<sup>191</sup>. L'axe nAG est donc indispensable à la morphogénèse post-embryonnaire (*Fig. 29*).

Il est important de noter que l'homologue chez le mammifère de nAG est uPAR<sup>192</sup>. Le récepteur à l'uPA (uPAR) est présent sur un grand nombre de cellules : cellules myéloïdes, cellules endothéliales, cellules épithéliales. Outre son rôle dans l'hémostase, l'activation de ce récepteur favorise la migration de ces cellules<sup>193</sup>. De plus, en absence d'uPAR, le recrutement de cellules immunitaires (neutrophiles) au cours d'une inflammation est inhibé. Ainsi, chez les mammifères, l'homologue de Prod1 semble être impliqué dans les processus de réparation tissulaire<sup>193</sup>.

On comprend ici que la composante nerveuse est nécessaire et indispensable pour permettre une régénération réussie que ce soit chez les animaux les moins évolués (salamandre) ou les plus évolués (souris). Les mécanismes cellulaires et moléculaires permettant un contrôle de la régénération par l'innervation sont encore inconnus.





*Les vertébrés inférieurs sont dotés de cette surprenante capacité à régénérer. Cette réparation tissulaire est dépendante de la mise en place d'une blastema. La mise en place de cette dernière est sous le contrôle de la réponse immunitaire et de l'innervation. Les cellules immunitaires sont responsables, quelques heures après la lésion, d'un burst oxydatif très court qui entraînera des vagues de prolifération et d'apoptose cellulaire. Quant à l'innervation, elle permettra au membre de la salamandre de repousser à l'identique, grâce à l'identité de position. Enfin, la blastema est constituée de cellules « souches » issues d'un stock de cellules indifférenciées ou d'une dé-différenciation de cellules matures après la lésion selon les organismes. L'ensemble de tous ces mécanismes est formidablement régulé dans le temps et dans l'espace pour permettre une régénération tissulaire parfaite.*

### **III. Réparation chez le mammifère : quelques cas de régénération**

#### **A. Cas de l'embryon et du nouveau né**

Juste après la naissance, si l'on coupe la pulpe du doigt chez un enfant, celle-ci repousse <sup>194</sup>. Cependant si la coupure est faite plusieurs jours après la naissance, cette régénération n'existe plus, sauf cas particulier.

Dans un autre modèle qu'est l'infarctus du myocarde, il a été montré que l'embryon et le nouveau-né (1 jour après la naissance) murins étaient dotés de la capacité à régénérer <sup>195</sup>. Cette régénération cardiaque est caractérisée par une prolifération de cardiomyocytes à partir de cardiomyocytes pré existants c-Kit<sup>+</sup> et une absence de fibrose, signant une régénération <sup>195,196</sup>. Elle est associée à une régénération fonctionnelle puisque le cœur retrouve une fonction systolique normale, deux mois après infarctus <sup>195</sup>. Cependant, si l'infarctus est fait sur des souris âgées de 7 jours après leur naissance, cette capacité est perdue. Deux conclusions sont à retenir de ces observations :

1. Les mammifères peuvent régénérer,
2. Un ou plusieurs évènements post-nataux inhibent les capacités de régénération chez le mammifère adulte.

Lors de la naissance, le bébé présente un système immunitaire adaptatif quasi-inexistant <sup>197</sup>. C'est au cours du développement postnatal que ce dernier va se développer et devenir efficace.



On peut émettre l'hypothèse qu'un des événements permettant d'expliquer la perte de régénération au cours de la vie du mammifère adulte soit l'acquisition d'un système immunitaire (trop ?) performant.

## **B. La « régénération » chez le mammifère adulte : ce que nous apprennent le foie et le muscle**

Il est classiquement admis que le foie et le muscle sont capables de régénérer. Je ne suis pas totalement d'accord avec ce concept. Concernant le muscle, une « régénération » est observée uniquement si la lésion est légère ou chimique. La régénération musculaire n'existe pas suite à une ablation massive.

Concernant le foie, lorsque l'on fait une hépatectomie, des phénomènes d'hyperplasie et d'hypertrophie compensatoires des lobes hépatiques restants du foie sont mis en place : le foie ne retrouve donc pas sa morphologie avant ablation. Peut-on alors parler de régénération ? Si de mon point de vue on ne peut pas parler de régénération, cette compensation contribue néanmoins au retour de l'intégrité fonctionnelle de l'organisme.

Cependant, de nombreuses études ont été faites sur la « régénération » de ces deux organes, chez le mammifère. Ces études nous permettent d'émettre des hypothèses de travail et peuvent être mises en parallèle avec ce qui a été découvert chez les vertébrés inférieurs. Ainsi, il me paraissait intéressant d'évoquer ici, une rapide synthèse des données actuelles.

### *1. Le foie*

Alors que le foie normal contient très peu de cellules prolifératives, les hépatocytes eux-mêmes sont capables de proliférer après lésion tout en gardant leur capacité de cellules fonctionnelles à faire de la néoglucogenèse<sup>198</sup>. Il existe également des progéniteurs endothéliaux (cellules stellaires ou cellules ITO), localisés dans l'espace de Disse qui peuvent proliférer puis se différencier en hépatocytes<sup>199</sup>. Les différentes cellules mises en jeu lors la « régénération » du foie dépendent de la lésion (ablation ou lésion chimique). Ceci peut être mis en parallèle avec les différentes cellules de la blastema (néoblastes ou cellules dédifférenciées) dans le cas de régénération des vertébrés inférieurs.

La prolifération des hépatocytes est dépendante de signaux inflammatoires, et plus particulièrement de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$ , ainsi que de l'HGF-A<sup>198</sup>.



Macrophages, cellules stellaires et cellules endothéliales sinusoïdales coordonnent cette régénération. En effet, ces dernières sécrètent Wnt2 et HGF ce qui entraîne la prolifération des hépatocytes <sup>200</sup>. Les cellules sinusoïdales ont un comportement différent en fonction du type de lésion : lors d'une lésion chronique, elles surexpriment CXCR-4 et répriment CXCR7 ce qui entraîne i) une augmentation de leur sécrétion d'HGF , ii) la prolifération et l'activation des cellules stellaires du foie, qui iii) sécrètent alors de manière excessive de la MEC, conduisant à une fibrose; Lors d'une lésion aiguë, la sécrétion de HGF et NGF par les cellules endothéliales sinusoïdales permet une activation différente des cellules stellaires qui entraîne la prolifération des hépatocytes (régénération) <sup>201</sup>.

## 2. *Le muscle*

Le muscle squelettique est connu comme étant capable de régénérer. Voyons dès à présent les différentes étapes permettant cette régénération.

### a) Nécrose des fibres musculaires

La première étape indispensable à la régénération de cet organe est la nécrose des fibres musculaires. Cette nécrose est induite par la sécrétion de la créatine kinase <sup>202</sup>. Cette phase précoce permet un recrutement rapide et massif de cellules immunitaires.

### b) Immunité et régénération musculaire

L'inflammation est importante dans les processus de régénération. Comme dans toute réponse inflammatoire, les neutrophiles sont les premières cellules de l'immunité innée à coloniser le muscle lésé (1 à 6h post lésion) <sup>202</sup>.

48h post-lésion, les macrophages M1 colonisent massivement la zone afin de débarrasser et nettoyer la zone lésée mais aussi pour activer la prolifération des cellules myogéniques, et plus particulièrement, des cellules satellites <sup>203</sup>. On pourrait d'ailleurs imaginer que la coopération cellules immunitaires / cellules myogéniques ne se fasse pas exclusivement au sein du muscle lésé : il a été montré, en 1988, que lors d'une lésion musculaire l'activation des macrophages du péritoine entraînait une meilleure régénération musculaire. Ainsi, le signal pourrait être systémique <sup>202</sup>. Les macrophages M2 colonisent la zone de lésion entre J4 et J10.



Chez les mammifères, comme chez la salamandre, les macrophages semblent jouer un rôle primordial dans la régénération musculaire <sup>169</sup>. En effet, si on déplete les macrophages, il n'y a pas de régénération dans le cœur <sup>201</sup>. Ces cellules seraient responsables de la sécrétion d'IGF1 (molécules classiquement connue comme étant, entre autre angiogénique). Ainsi, si on surexprime IGF1 post infarctus, une régénération cardiaque est observée. Cette surexpression autocrine d'IGF1 est à l'origine de l'augmentation du nombre de macrophages M1 à des temps précoces (J2) et M2 à des temps plus tardifs (J8/J10) au niveau de la lésion (N Rosenthal, congrès Bases cellulaires et moléculaires de la régénération, Keystone, janvier 2016.).

Ces résultats sont cohérents avec les nombreuses autres données de la littérature qui démontrent le rôle majeur de la séquence des réponses pro- et anti-inflammatoires au cours de la régénération musculaire. Ainsi, il semble indispensable d'avoir une réponse immunitaire pro-inflammatoire suivie rapidement d'une réponse anti-inflammatoire pour la régénération du muscle. Il est fortement probable que cette affirmation soit extrapolable à la régénération d'autres tissus (peau, foie, ...).

Ainsi, on voit que la balance M1/M2 est très importante pour la régénération <sup>204</sup>. Il a également été montré que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- $\alpha$ ), par les macrophages pro-inflammatoires, induit une prolifération de progéniteurs musculaires et leur différenciation précoce (expression MyoD, Myf5) alors que les macrophages anti-inflammatoires entraînent la différenciation tardive des cellules satellites, qui sont les cellules souches musculaires (expression Myogenine et MEF2)<sup>205 206</sup>. De plus, après lésion du muscle squelettique, alors que les M1 seraient responsables du recrutement des FAPs (Fibrocytes Adipogenic Progenitors), les macrophages de type M2, *via* une libération de IL-4 et IL-13 sont responsables de la prolifération des FAPs <sup>207</sup>. En parallèle, l'IL-4 inhibe la différenciation de ces cellules en adipocytes. En plus de produire de la MEC, ces FAPs sont responsables de i) la phagocytose des débris cellulaires sur la zone de lésion <sup>207</sup> et ii) de l'augmentation de la différenciation myogénique des cellules satellites <sup>207,208</sup>. Le recrutement de ces FAPs est indispensable à la régénération musculaire squelettique <sup>209,208</sup>.

Plus tardivement, les cellules de l'immunité adaptative migrent vers la zone lésée. Nadia Rosenthal montre que l'une des différences significatives entre les mammifères et la salamandre réside dans les cinétiques d'arrivée de ces cellules.





En effet, chez la salamandre, les lymphocytes, neutrophiles et macrophages apparaissent entre 12 et 24 h alors que chez le mammifère, les lymphocytes sont plutôt recrutés aux alentours de 7 jours<sup>210</sup>.

#### c) Rôle des cellules souches au cours de la régénération musculaire

La capacité de régénération est décrite comme dépendante des cellules satellites. Les cellules souches satellites sont des cellules mononuclées Pax7+ qui sont retrouvées chez les mammifères, les oiseaux, les reptiles et les amphibiens<sup>202</sup>. En condition physiologique, ces cellules sont quiescentes, juxtaposées aux fibres musculaires. Elles assurent la croissance des fibres musculaires. Suite à une lésion, ces cellules satellites s'activent, c'est à dire qu'elles sortent de leur état de quiescence : elles se divisent alors de façon asymétrique et l'une des cellules fille exprime alors le facteur MyoD (facteur de détermination musculaire) et se différencie en progéniteur myogénique (myoblaste). Les myoblastes, prolifèrent, se différencient en myocytes, puis fusionnent pour donner des fibres musculaires et assurer la régénération du muscle lésé. L'autre cellule fille issue de la division asymétrique « échappe » à la prolifération, permettant ainsi de garder un stock de cellules souches<sup>211</sup>.

Les facteurs les plus connus pour activer les cellules satellites sont le HGF (prolifération et migration), le FGF (prolifération et fusion), l'IGF et le TGF- $\beta$ . Il a été montré que la niche de ces cellules satellites est importante. Cette niche renferme entre autre, des progéniteurs fibroblastiques adipocytaires (les FAPs) ainsi que des cellules immunitaires (principalement les macrophages)<sup>212</sup>. Ces cellules souches satellites sont activées par un signal dit « d'alarme ». Il a récemment été montré qu'après lésion tissulaire et activation des systèmes d'hémostase associés, la thrombine permettait de cliver le pro-HGF-A (Hepatocytes Growth Factor A) en HGFA. Ainsi, l'HGFA constitue un réel signal d'alerte pour l'organisme permettant une réponse globale. Il permettrait à l'ensemble des cellules souches de l'organisme<sup>202</sup> de passer d'un état quiescent à un état activé afin de régénérer le muscle<sup>213</sup>. Ainsi aucune régénération n'est observée chez les souris dont l'HGFA n'est pas fonctionnel. Enfin, de manière surprenante, l'apport de HGFA sur une zone de lésion cutanée de souris entraîne une réparation tissulaire rapide et quasi sans marque



cicatricielle (Joseph T Rodgers, congrès Bases cellulaires et moléculaires de la régénération, Keystone, janvier 2016).

*Ainsi, pour la « régénération » hépatique et musculaire chez les mammifères adultes, on retrouve les mêmes molécules que celles impliquées dans la régénération chez les vertébrés inférieurs ; à savoir les facteurs de croissance : HGF, EGF, TNF- $\alpha$ , VEGF, FGF, IGF et les cytokines IL-1, IL-6 ainsi que la présence de cellules « souches ».*

### **C. La régénération chez le mammifère adulte : cas particulier de la souris**

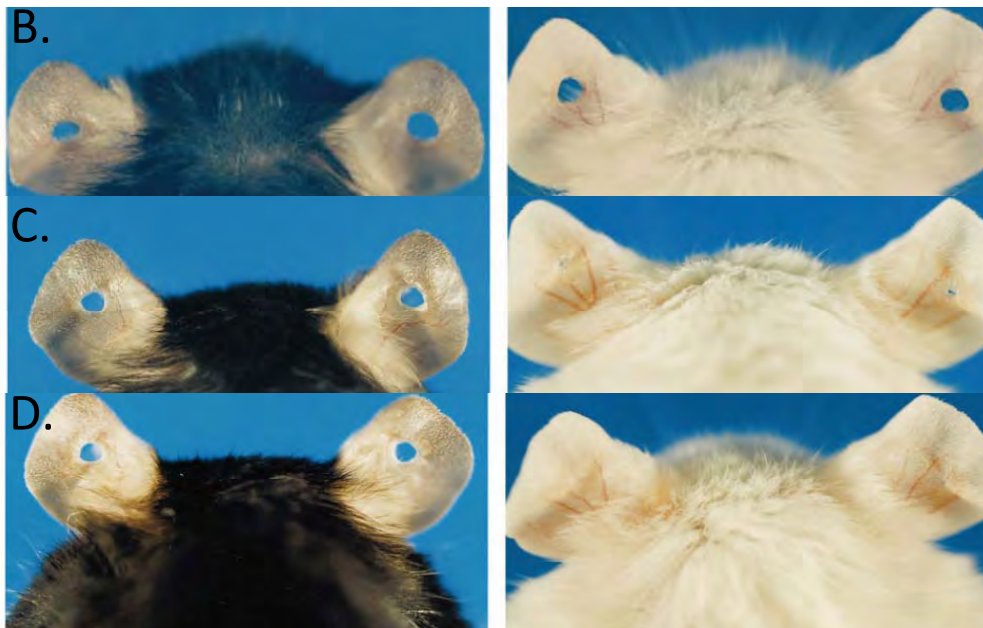
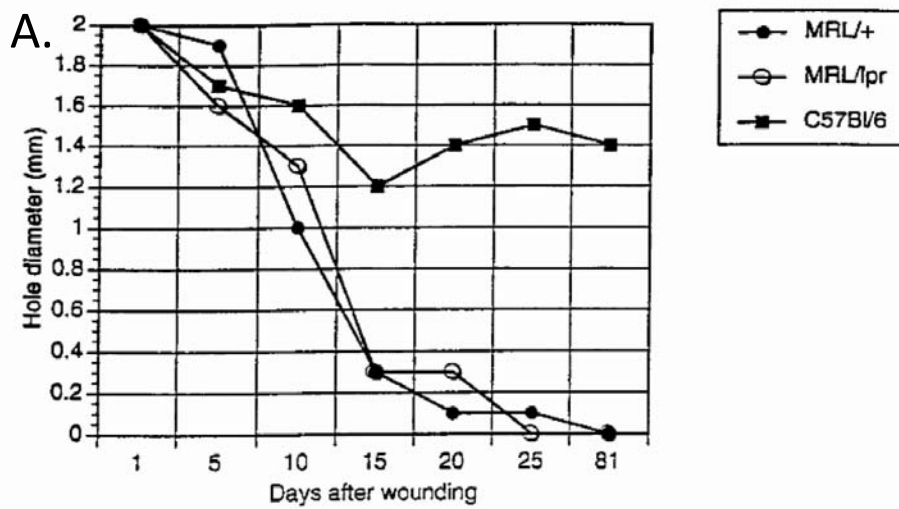
#### **MRL**

Comme nous venons de le voir, la majorité des mammifères adultes cicatrisent. Aujourd'hui, il existe deux exceptions puisque deux souches de souris dites « sauvages » sont dotées de cette capacité de régénérer : la souris *Acomys* ou souris épineuse du désert<sup>214,215</sup> et la souris MRL. La souris *Acomys* est capable de régénérer sa peau et ses annexes cutanées après une blessure massive, et ce, sans cicatrice. Très récemment, il a été montré que cette régénération serait associée à i) une quantité de macrophages pro-inflammatoires très diminuée ainsi qu'un bas niveau de cytokines pro-inflammatoires, ii) une neutropénie, iii) un grand nombre de mastocytes, et iv) peu de collagène en comparaison avec la souris *Mus Musculus* qui ne régénère pas<sup>215</sup>. Cette très récente étude est surprenante : au regard des données bibliographiques sur la régénération et l'implication des phases pro puis anti-inflammatoires (chez la salamandre ou chez le mammifère), on aurait pu penser que la souris *Acomys*, qui régénère, présenterait une grande quantité de neutrophiles et macrophages.

Seules deux études concernent la souris *Acomys* c'est pourquoi nous nous attardons ici sur la souris MRL.

#### ***1. MRL et pathologie auto-immune***

La souris Murphy Roths Large MRL/MpJ (MRL) est considérée comme une souche de souris sauvage puisqu'elle a été générée grâce à une série de croisements de souris de différentes souches : C57BL/6J (0.3%), C3H/HeDi (12.1%), AKR/J (12.6%) et LG/J (75%). On utilise la souris MRL comme contrôle des souris MRL/MpJ-*Fas*<sup>lpr</sup> chez qui le récepteur Fas (ou CD95 qui lorsqu'il est activé



**Figure 30 : Régénération de l'oreille de la souris MRL, en comparaison à la souris C57BL/6**

A. La souris MRL (MRL/+) et MRL/Fas<sup>Lpr</sup> (MRL/Lpr) ont une régénération parfaite, 80 jours après punch de 2 mm<sup>2</sup>, contrairement à la C57BL/6.

B. Comparaison macroscopique de la réparation tissulaire, J1 après le punch chez la C57BL/6 (souris noire) et chez la souris MRL/MpJ (souris blanche)

C. Comparaison macroscopique de la réparation tissulaire, J20 après le punch

D. Comparaison macroscopique de la réparation tissulaire, J33 après le punch

*De Clark, 1998*

déclenche l'apoptose) est muté. La durée de vie de la souris MRL est de 93 semaines pour les mâles et 73 pour les femelles (contre 22 et 17 semaines chez les MRL/MpJ-*Fas*<sup>lpr</sup>)<sup>216</sup>. La souris MRL est dite lymphoproliférative : elle développe une grande prolifération de lymphocytes T, conséquence d'une trop faible quantité d'IL-2<sup>217,218</sup>. La souris MRL produit également une grande quantité d'auto-anticorps (IgG1) qui serait dépendante d'une production excessive d'IFN $\gamma$  (Interferon gamma)<sup>216</sup>. La conséquence est le développement d'une pathologie auto-immune nommée lupus érythémateux. Cette pathologie est caractérisée par des inflammations vasculaires, des problèmes articulaires et dermatologiques, une lymphadénopathie massive entraînant des problèmes rénaux, puis la mort des souris. Macroscopiquement, les souris MRL présentent une organomégalie. Cette dernière peut être corrélée à un métabolisme particulier<sup>219</sup>. En comparaison avec les souris C57BL/6, les souris MRL présentent un grand nombre de mécanismes moléculaires, métaboliques et cellulaires communs avec ceux impliqués dans le développement dans le développement embryonnaire<sup>219</sup>. Enfin, ces souris possèdent de grandes capacités de régénération. Leur métabolisme, dit embryonnaire-like, pourrait entre autre, être un élément important dans la régénération.

## 2. MRL et régénération

Il a été montré que cette souche de souris est capable de régénérer plusieurs, à l'âge adulte, plusieurs organes, notamment: la phalange du bout du doigt, le cœur, l'oreille.

### a) Régénération de l'oreille

La régénération de l'oreille est la plus étudiée. Dès 1998, le groupe d'Heber-Katz E montre que la MRL régénère son oreille en 4 mois après un punch de 2mm, alors que l'oreille des souris C57BL/6 cicatrise<sup>220</sup> (*Fig. 30*). Chez la souris MRL, il y a mise en place d'une structure que les auteurs qualifient de « blastema de régénération », caractérisée par la prolifération et la migration de cellules épithéliales, 2 jours après lésion<sup>220</sup>. De plus, par étude histologique, les auteurs mettent en évidence que la souris MRL présente une hyperhémie ainsi qu'un gonflement (afflux de cellules immunitaires ?) sur la zone de lésion, contrairement à la souris C57BL/6. Il est intéressant de noter qu'il y a émergence d'adipocytes à



partir de progéniteurs adipocytaires Pref-1<sup>+</sup>, dans l'oreille régénérée de la MRL<sup>220,221</sup>.

Nous avons vu précédemment que, le recrutement et la prolifération des FAP étaient indispensables pour la régénération musculaire. Chez la MRL, on note la présence de progéniteurs adipeux lors de la régénération. On pourrait donc penser qu'il existe un lien entre progéniteurs adipeux et régénération. On pourrait se demander si ces progéniteurs ont un rôle « purement » trophique ou si ils sont à la base d'une régénération aboutie.

#### b) Régénération cardiaque

Lors de la régénération cardiaque chez la MRL, on retrouve également i) une forte activation de l'angiogenèse, ii) une migration des cardiomyocytes sur la zone de lésion, iii) une prolifération de ces cellules, et iv) une diminution de synthèse de la MEC (et plus particulièrement les collagène de type 1), à la différence de la souris C57BL/6, qui ne régénère pas<sup>222</sup>.

On note donc que les mécanismes de prolifération, d'immunité, de remodelage tissulaire (*via* l'activation des MMP et des TIMPs) sont les mêmes que ceux impliqués dans la régénération des animaux moins évolués (vertébrés inférieurs, poissons,...)

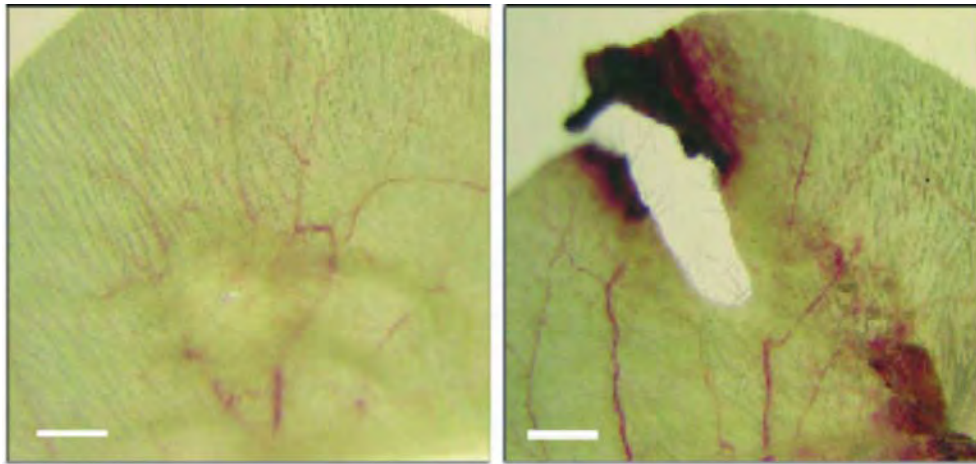
#### c) Régénération du bout du doigt

Une étude sur la comparaison des mécanismes cellulaires après amputation du doigt chez les souris MRL et C57BL/6 montre que la majorité des événements a lieu chez les deux espèces de souris mais ne suivent pas la même cinétique<sup>223</sup>. Ainsi, ce ne serait pas forcément l'activation d'un événement qui aurait de l'importance mais le moment auquel cet événement intervient.

#### d) Régénération et remodelage tissulaire : implication des métalloprotéases

Chez la souris MRL, dotée de la capacité à régénérer, l'activité des MMP est cruciale. En effet, dès les premières heures après punch, les souris MRL présentent une activité métalloprotéasique matricielle bien plus importante que chez les souris C57BL/6. Elles synthétisent des MMPs membranaires (MMP-2 qui dégrade les collagènes de types I, II, IV, V, VII, X, XI, gélatine, élastine, fibronectine etc...) et

### *Dénervation*



**Figure 31 : Implication de l'innervation au cours des processus de régénération chez la MRL**

La dénervation chirurgicale de l'oreille avant punch, chez la souris MRL, inhibe la régénération de cet organe.

*De Buckley, 2012*



sécrétées (MMP-9 qui dégrade les collagènes types IV, V, XI, XIV, XVIII, gélatine, élastine et laminine). Cette augmentation d'activité est due à une augmentation du nombre de cellules positives pour les MMPs, cellules de petites taille s'apparentant à des neutrophiles <sup>224</sup>. En revanche, l'activité des inhibiteurs des MMPs (TIMP-1 et TIMP-2) est diminuée chez les MRL en comparaison avec les souris C57BL/6.

#### e) MRL et innervation

##### Innervation et régénération

Comme pour les vertébrés inférieurs, Buckley et coll ont montré que la régénération de l'oreille est dépendante de l'innervation <sup>225</sup>. En effet, la dénervation avant amputation inhibe la formation de la blastema, la chondrogenèse et la ré-épithélisation, ce qui a pour conséquence une augmentation de la taille de lésion (nécrose) <sup>225</sup> (*Fig. 31*). La dénervation inhibe donc les capacités de régénération de cette souche de souris.

##### Innervation et immunité

Il a été montré que les souris MRL présentent des différences d'innervation. En effet, Zoukhri et Kalbrin montrent qu'au cours de la mise en place du lupus érythémateux chez la souris MRL, l'activité des nerfs autonomes parasympathiques est modifiée dans les glandes lacrymales et salivaires (infiltrées anormalement par des lymphocytes T) : les nerfs sont activés mais libèrent moins d'acétylcholine <sup>226</sup>. Une autre étude montre que l'innervation autonome sympathique et maladie auto-immune pourraient être liées puisque la souris MRL âgée possède beaucoup moins de fibres nerveuses autonomes sympathiques que des souris C57BL/6 du même âge <sup>227</sup>. On sait que les fibres nerveuses noradrénergiques sont retrouvées autour des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses, mais également à proximité des lymphocytes T et des macrophages <sup>228</sup>. Bien qu'assez peu nombreuses, les données présentées sont cohérentes, compte tenu de cette proximité structurale et de la corrélation inverse entre l'innervation et maladie auto-immune. On sait aujourd'hui que les lymphocytes et les macrophages possèdent des récepteurs noradrénergiques. Il a été montré que l'innervation autonome sympathique contrôlait la réponse immunitaire *via* la modulation d'activité des cellules immunitaires innées (macrophages, neutrophiles, ...) et adaptatives (Lymphocyte B, T, ...) <sup>229,230,231,232</sup>.



Le système nerveux sensoriel, lui aussi, *via* des libérations locales de substance P (SP) et CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide) <sup>233</sup>, peut interagir avec le système immunitaire en faveur d'une action plutôt pro-inflammatoire <sup>234,235</sup>. Les opioïdes endogènes, produits après activation du système nerveux sensoriel, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, en réponse à une information nociceptive, semblent également jouer un rôle puisqu'il a été montré dans plusieurs modèles d'animaux présentant une maladie auto-immune (souris MRL, poulet présentant une thyroïdite) que la concentration centrale d'opioïdes endogènes était très basse <sup>236</sup>.

*Pour conclure, on peut voir que la cicatrisation et la régénération sont deux processus qui partagent la plupart des acteurs cellulaires et moléculaires. Cependant, les mammifères adultes et les vertébrés inférieurs (avec les souris MRL) présentent des réparations tissulaires différentes : les premiers cicatrisent alors que les seconds régénèrent. Il apparaît dans ce chapitre, deux évidences, les cinétiques différentes en terme de réponse immunitaire (les cellules immunitaires colonisent la zone de lésion bien plus rapidement chez les organismes qui régénèrent) mais également la nature des cellules immunitaires présentes après la lésion (présence d'une immunité adaptative plus performante chez les mammifères adultes que chez les vertébrés inférieurs, et une immunité « pathologique » chez la souris MRL).*

*Enfin, on note que les cellules souches (foie et muscle chez le mammifère mais aussi chez les vertébrés inférieurs) sont indispensables à ce processus de régénération. C'est l'environnement de ces cellules souches qui conditionne leur capacité à proliférer et à participer de manière positive aux processus de régénération (voir foie, muscle). On sait, notamment pour la peau, que ces cellules souches (leur quiescence, leur activation, leur prolifération puis leur différenciation) sont sous le contrôle de l'innervation, comme c'est le cas dans la blastema des vertébrés inférieurs.*

*Ainsi, afin de réussir à orienter la réparation tissulaire chez le mammifère adulte vers une régénération, il me paraît nécessaire de créer des liens entre cellules immunitaires, innervation et cellules souches, ce que j'ai cherché à établir au cours de ma thèse en comparant la réparation tissulaire chez une souris qui cicatrise (C57BL/6) et la souris qui régénère (MRL).*



# **Chapitre III :**

## **Les opioïdes**

### **I. Nociception et douleur : mécanismes et différences**

La notion de nociception (du latin *nocere*, nuire / faire du mal) a été développée par Charles Sherrington dès le début du XXème siècle<sup>237</sup>.

La nociception se définit comme le processus neurologique d'encodage et d'analyse de l'ensemble des signaux qui menacent l'intégrité du corps. La perception de ces signaux d'alarme par les nocicepteurs (= neurones nociceptifs) déclenchent des réponses réflexes et comportementales (réflexes défensifs, réflexes d'échappement afin de soustraire l'organisme au stimulus nocif, réflexes viscéraux) qui permettent la sauvegarde de l'intégrité et qui sont généralement associées à la perception d'une douleur. L'importance de la nociception est évidente quand on regarde les personnes souffrant d'une insensibilité congénitale à la douleur : ces patients naissent avec un déficit des processus de la nociception et vivent avec le risque permanent de s'autodétruire (fracture osseuse, brûlures graves, amputation indolores, ...) puisqu'ils ne réalisent jamais quand ils se font mal et meurent en général assez jeunes<sup>238</sup>.

Une confusion est souvent faite entre nociception et douleur. D'après l'IASP (International Association for Study of the Pain), la douleur se caractérise par « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable » liée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles, ces dernières étant alors décrites par l'individu comme une lésion « vraie ». Les deux termes « nociception » et « douleur » ne sont donc pas synonymes. La nociception est un processus sensoriel à l'origine d'un message nerveux, qui peut *in fine* conduire à la sensation consciente désagréable qu'est la douleur. Les nocicepteurs peuvent être activés sans qu'il y ait douleur (lors d'un stress intense ou d'une forte émotion) et inversement, une douleur peut être présente sans qu'il y ait activation des nocicepteurs (douleur du membre fantôme par exemple).

	Canaux / récepteur	Stimuli
Activés par stimuli thermiques	TRPV 1 TRPV2,3,4 <sup>(1)</sup>  TRPM8 <sup>(1)</sup>  TREK (Canaux K+) <sup>(4)</sup>	Chaud (Sup à 43°C)  Froid (inf à 15°C)  Chaleur
Activés par stimuli mécaniques	TRPV <sup>(1)(2)</sup> , ASIC 3 <sup>(4)</sup>  TREK1, TRAAK <sup>(4)</sup>  Piezzo <sup>(4)</sup>	Pressions, étirements
Activés par agents chimiques	TRPM8, TRPV1 <sup>(1)(3)</sup>  TRPA1 <sup>(1)</sup>  RCPG <sup>(1)</sup>  ASICS (Canaux K+) <sup>(4)</sup>  TASK (canaux K+) <sup>(4)</sup>	Menthol, Piment, Capsaïcine  Moutarde, Wasabi, acide  Molécules de l'inflammation (cytokines)  Sensible aux protons

**Figure 32 : Les différents canaux présents sur les nocicepteurs et leurs stimuli**

TRPV : Transient Receptor Vanilloid; TRPM : Transient Receptor Potential Mucolipin, ASIC : Acid Sensibility Ionic Canals ; Na<sub>v</sub> : Canaux sodiques voltage-dependants; Ca<sub>v</sub> : Canaux Calciques Voltage-dependants ; TREK : TWIK1-related K<sup>+</sup> channels; TRAAK: TWIK1-related arachidonic acid sensitive K<sup>+</sup> channels; RCPG : Récepteur Couplé à une Protéine G ; TASK : TWIK1-related acid sensitive K<sup>+</sup> channels.

- (1) Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G. & Julius, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* **139**, 267-284, doi:10.1016/j.cell.2009.09.028 (2009).
- (2) Muraki, K. et al. TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circulation research* **93**, 829-838
- (3) Caterina, M. J. et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* **288**, 306-313 (2000).
- (4) Bouhassira D et Calvino B. *Douleurs : physiologie, physiopathologie et pharmacologie*. 2009

### **A. Bases moléculaires de la nociception**

Les signaux d'alarme à l'origine de la nociception peuvent être de nature mécanique (pression excessive, déformation mécanique, coupure,...), thermique (chaud, froid), ou chimique (acides, capsaïcine, toxines d'araignées...). Les systèmes permettant la détection de ces stimuli sont des canaux ioniques membranaires qui se localisent au niveau de la terminaison de neurones nociceptifs. La *figure 32* reprend les différents canaux impliqués dans la détection de ces stimuli. Ces canaux ioniques ont un seuil d'activation élevé voir très élevé, contrairement aux autres systèmes sensoriels. Par ailleurs, les nocicepteurs ne présentent pas ou très peu d'adaptation (des potentiels d'actions sont émis dès le dépassement du seuil d'activation avec peu ou pas de modification de leur fréquence au cours du temps). Ces deux caractéristiques permettent à ces neurones de remplir leur rôle de système d'alerte.

En condition normale, ces canaux sont activés par i) des stimulations intenses et brèves ou ii) des stimulations chroniques (nociception pathologique) <sup>239</sup>.

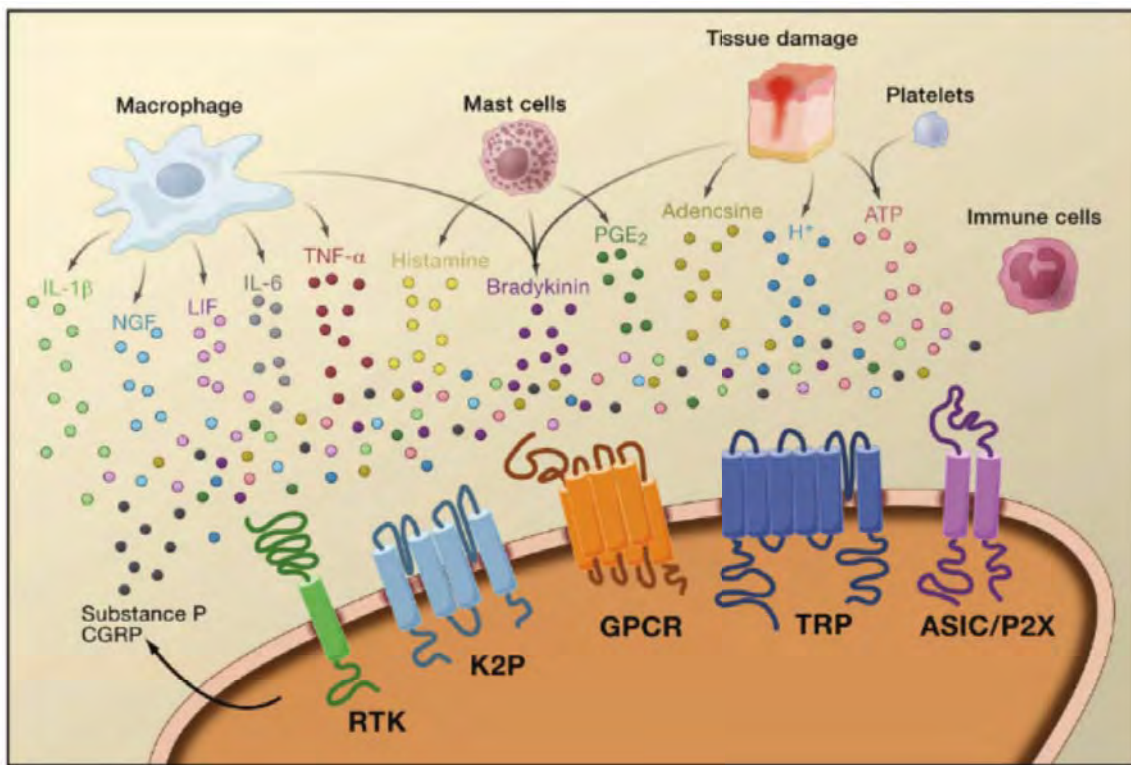
On a longtemps pensé que ces canaux ioniques étaient spécifiques d'un stimulus. En réalité, ils sont très souvent capables de détecter plusieurs stimuli (notamment les stimuli chimiques et peuvent être modulés par des ligands endogènes « non nocifs » (tels que les endocannabinoïdes, la N-acyl-Taurine ou l'acide arachidonique...)) <sup>240-242</sup>.

Enfin, ces canaux ont la capacité i) de s'hétéromultimériser et ii) d'interagir avec des récepteurs couplés à des protéines G, interaction qui peut conduire à l'activation du canal en absence du stimulus nocif, ou du moins en quantité inférieure au seuil (exemple du couplage entre le canal TRPA1 et le récepteur B2 à la Bradykinine) <sup>243</sup>. Ce type d'interaction joue un rôle fondamental lors de l'inflammation à laquelle est associée la douleur inflammatoire (*cf paragraphe I, D*) (*Fig. 33, 35*).

### **B. Les neurones nociceptifs : les nocicepteurs**

D'un point de vue phylogénétique, les nocicepteurs sont retrouvés chez les invertébrés (aplysie, sangsue) et chez les vertébrés.

Les nocicepteurs sont présents dans toutes les parties du corps pour détecter des stimuli nocifs externes (au niveau de la peau, la cornée, les muqueuses) et internes



**Figure 33 : Douleur inflammatoire**

Après une lésion tissulaire, les cellules inflammatoires (macrophages, mastocytes, neutrophiles) mais aussi les cellules endothéliales et kératinocytes, les fibroblastes et cellules stromales du tissu lésés sécrètent une « soupe inflammatoire ». Cette dernière est composée d'IL-1 $\beta$ , NGF, TNF- $\alpha$ , endocannabinoides, CGRP, ATP, histamine, glutamate et aussi opioïdes endogènes. Ces facteurs agissent directement sur leur récepteurs (nocicepteurs chimiques) qui sont des RCPG, des canaux TRP (Transient Receptor Potentiel), des ASIC (canaux ioniques sensibles à l'acidité), RTK (Receptor Tyrosine Kinases) ou K2P (canaux potassique) entraînant une hypersensibilité des fibres nerveuses sensorielles puis la libération de neuromédiateurs tels que la substance P et le CGRP.

*De Basbaum, 2009*



(au niveau des muscles, des articulations, des viscères). Pour la peau, par exemple, la densité moyenne des terminaisons nociceptives n'est en aucun cas inférieure à 600 par cm<sup>2</sup>. Ce sont des neurones sensoriels dont le corps cellulaire se localise dans le ganglion de la racine dorsale de la moelle épinière ou dans les ganglions trigéminaux au niveau du bulbe rachidien. Ces neurones possèdent deux axones : un qui innerve les tissus périphériques et un qui projette dans le système nerveux central (moelle épinière, bulbe rachidien) <sup>244</sup>. Cette morphologie, appelée pseudo-unipolaire, est très conservée entre les espèces <sup>239</sup>. Au niveau médullaire et bulbaire, ces nocicepteurs sont excitateurs par la libération de glutamate, mais ils peuvent aussi libérer des neuropeptides (substance P, CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide) ...) et des neurotrophines telles que le BDNF (Brain-derived Neurotrophic Factor).

L'axone périphérique se termine, au niveau du tissu innervé, par des « terminaisons libres » (non organisées en « organe sensoriel ») qui sont capables de libérer les neurotransmetteurs par exocytose <sup>233</sup>.

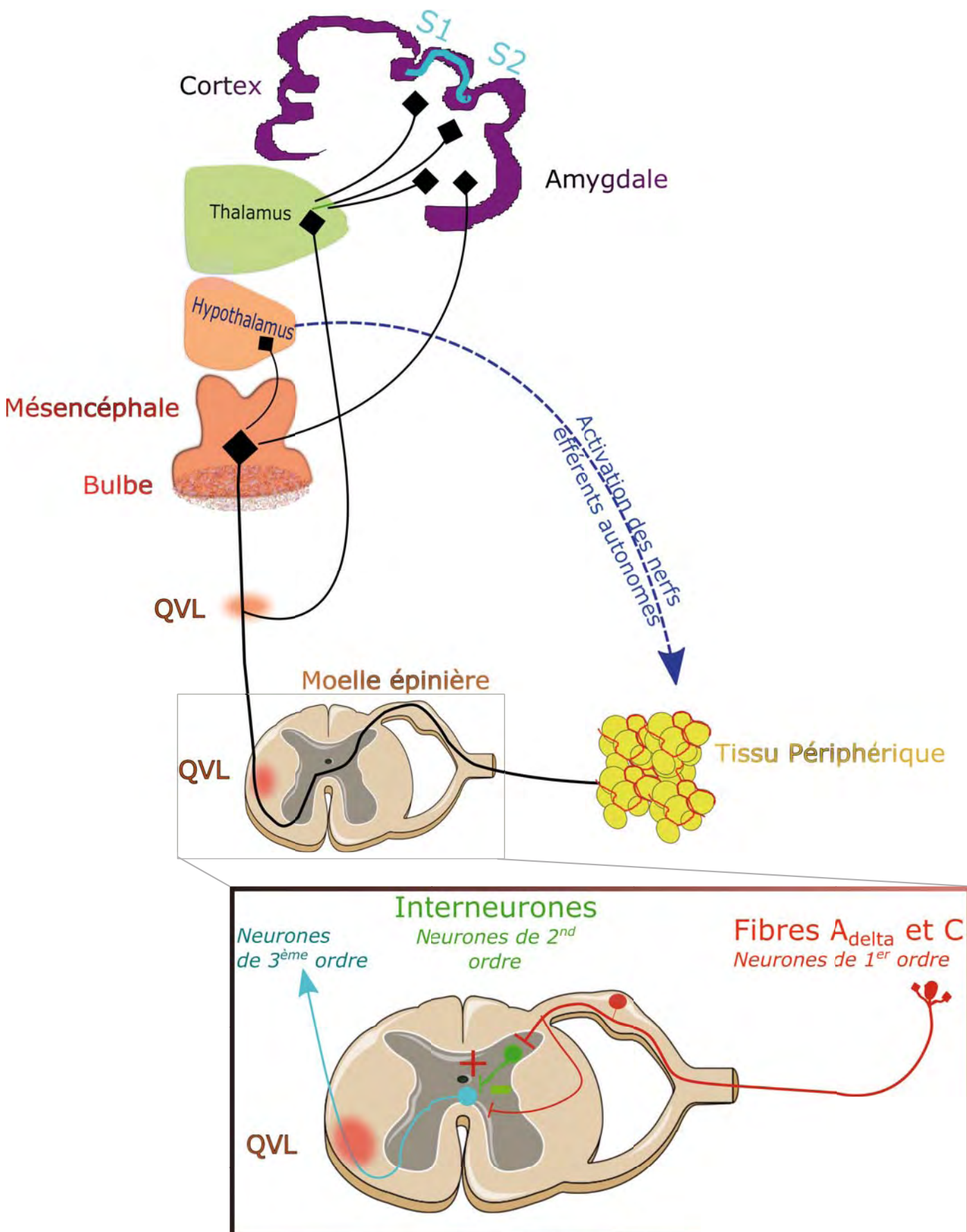
Même si les nocicepteurs peuvent être classés par leur seuil de sensibilité aux stimuli (mécanique, thermique ou chimique), la classification la plus courante se fait en fonction de la myélinisation des deux axones qui le constituent. Ainsi, on distingue :

### *1. Les fibres afférentes myélinisées Aδ*

Ces neurones (ou fibres) ont un axone dont le diamètre est compris entre 1 à 5 µm et une vitesse de conduction rapide de l'ordre de 5 à 30 m/s. Ces neurones permettent une localisation anatomique précise du stimulus (zone de piquûre, par exemple). Ils sont moins nombreux que les neurones nociceptifs non myélinisés mais sont plus rapides, plus efficaces et plus difficilement activables (seuil d'activation plus élevé).

### *2. Les fibres afférentes non myélinisées C*

Leur diamètre est plus petit (0,3 à 1,5 µm) et elles conduisent lentement le message nociceptif (vitesse inférieure à 2 m/s). A la différence des fibres afférentes myélinisées, ces fibres indiquent une localisation plus diffuse de la zone de stimulation par le stimulus. Ces fibres sont les plus sensibles à la capsaïcine -



### Voie 34 : Voie neuro-anatomique de la nociception

La libération de neurotransmetteurs (NT) par les fibres A $\delta$  et C de premier ordre (**rouges**) qui sont activées, se fait dans la corne dorsale de la moelle épinière. Les interneurones (neurones de second ordre, **verts**) libèrent à leur tour des NT excitateurs (+) ou inhibiteurs (-), agissant sur les neurones de troisième ordre (**bleus**) qui projeteront dans le mésencéphale, l'hypothalamus, thalamus et le cortex insulaire (S1 et S2) et cingulaire ainsi que l'amygdale.

QVL : quadrant ventro-latéral de moelle épinière

principe actif du piment - c'est pourquoi le traitement par une forte concentration de cette drogue entraîne une destruction préférentiellement de ces fibres <sup>245</sup>.

Ces fibres C sont subdivisées en deux groupes selon leur capacité à libérer ou pas des peptides au niveau synaptique. On distingue ainsi :

-Les fibres afférentes C peptidergiques : Elles libèrent, en plus du glutamate, des neuropeptides tels que la Substance P, le CGRP (Calcitonin-Gené related Peptide) et la somatostatine. Elles expriment aussi le récepteur TrkA (Tropomyosin receptor Kinase A) au NGF (Neural Growth Factor).

-Les fibres afférentes C non peptidergiques : ces dernières possèdent le récepteur au GDNF (Glial-Derived Neurotrophic Factor) ainsi que les récepteurs purinergiques à l'ATP, P2X3.

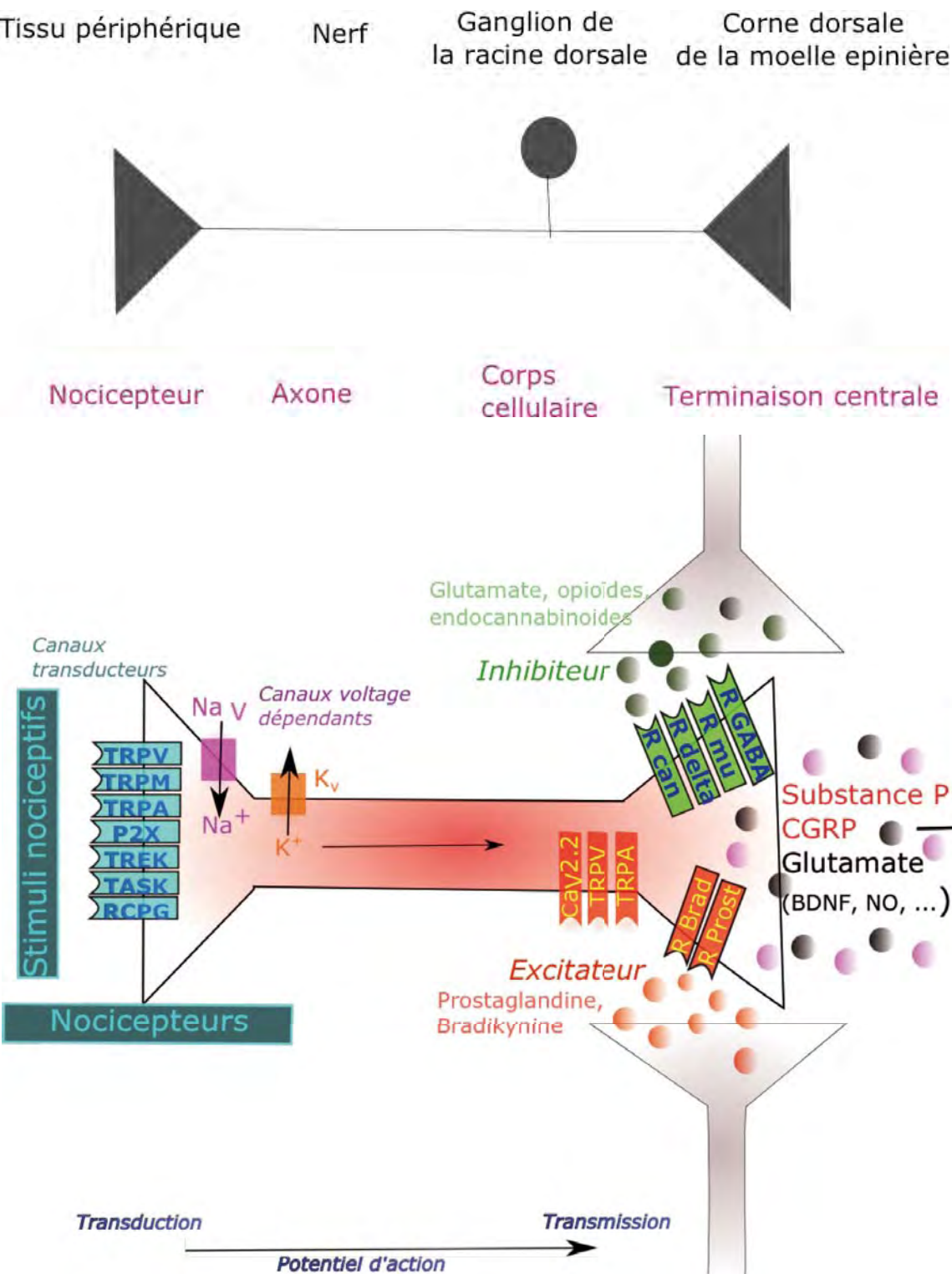
On peut dorénavant noter que l'ensemble des fibres nociceptives (A $\delta$  et C) expriment les récepteurs aux opiacés de type  $\mu$  ou  $\delta$  <sup>246</sup>.

Une parenthèse peut être faite pour signaler que les tissus périphériques sont également innervés par des fibres sensibles myélinisés, de grand diamètre et une conductance du signal très rapide : ce sont les A $\beta$ . Elles sont impliquées dans la perception des stimuli non douloureux comme la caresse.

### **C. Les voies de la nociception**

L'information nociceptive (intensité, durée) est codée au niveau de l'axone périphérique sous forme de potentiels d'actions. Cette information gagne le système nerveux central (moelle épinière, bulbe rachidien) *via* l'axone central du neurone nociceptif pour être transmise à des neurones de second ordre (*Fig. 34*). La distribution antéro-postérieure et médio-latérale des terminaisons axonales des neurones nociceptifs reflète la localisation anatomique des axones périphériques (représentation de la partie du corps innervée) alors que la répartition dorso-ventrale reflète l'identité du neurone nociceptif (donc la nature du stimulus activateur).

Une fois transmise aux neurones de second ordre, l'information remonte *via* le faisceau spino-thalamique (ou par le faisceau trigémino-thalamique pour les informations issues de la face et traitées au niveau du bulbe rachidien) contralatéral, jusqu'au thalamus puis jusqu'au cortex somesthésique. Une partie de ces informations nociceptives ne passe pas par le thalamus mais par l'amygdale et se



**Figure 35 : La transduction du signal nociceptif**

1. L'activation des récepteurs sensibles aux stimuli nociceptifs (canaux ioniques) sur les terminaisons périphériques entraîne un potentiel de récepteur d'amplitude et de durée variable.
2. Si le seuil de dépolarisation des canaux voltage-dépendants ( $Na_v$ ) est atteint, un ou plusieurs potentiel d'action sont générés. Les canaux potassiques ( $K_v$ ) s'ouvrent pour repolariser la membrane du neurone.
3. Au niveau de la corne dorsale de moelle épinière, le potentiel d'action induit l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant, entraînant la libération de neurotransmetteurs (NT). Ces NT vont alors activer ou inhiber des récepteurs sur les terminaisons post synaptiques de la moelle épinière. Le signal sera alors transmis au centre supérieur du cerveau par les voies ascendantes

termine au niveau des cortex insulaire et cingulaire. La sensation consciente de la douleur est issue de l'activation de l'ensemble de ces différentes régions corticales. En réponse à l'intégration centrale du message nociceptif, des réponses réflexes végétatives sont activées permettant ainsi de remédier au signal d'alarme (fuite, ...) (Fig. 34).

Depuis longtemps, on connaît la différence entre la réalité objective d'un stimulus douloureux et sa répercussion subjective. De nombreuses études ont depuis démontré l'influence des émotions sur la perception douloureuse et la capacité du système nerveux central à moduler la transmission des messages nociceptifs ascendants. Cette modulation peut être « positive » (potentialisation du message nociceptif, effet hyperalgésique) ou « négative » (atténuation du message nociceptif, effet analgésique). Cette modulation est due à l'activation de voies descendantes qui modulent, *in fine*, la transmission synaptique entre le neurone nociceptif et le neurone de second ordre. Ces voies descendantes sont sous le contrôle des opiacés à tous les niveaux (cortex somesthésique, hypothalamus, substance grise périaqueducule et corne dorsale de la moelle épinière) (Fig. 34).

#### **D. Inflammation et nociception**

La lésion d'un tissu s'accompagne de l'accumulation de nombreux et divers facteurs libérés par les cellules immunitaires activées résidentes ou recrutées sur la zone de lésion (mastocytes, granulocytes basophiles, plaquettes, macrophages, neutrophiles), les cellules endothéliales, les fibroblastes et les terminaisons nociceptives elles-mêmes. L'ensemble des facteurs libérés dans ces situations est souvent regroupé sous le terme de « soupe inflammatoire » et va entraîner une sensibilisation (diminution du seuil d'activation des canaux) des terminaisons nociceptives ou prolonger la durée de leur activation. Le rôle de cette réduction du seuil de déclenchement douloureux est une protection réflexe des zones lésées<sup>239</sup>. Dans des conditions extrêmes, l'inflammation peut conduire à l'activation de neurones nociceptifs en absence de tout stimulus nocif<sup>247</sup>.

Les neurones nociceptifs possèdent un grand nombre de récepteurs à ces facteurs ainsi que des récepteurs de la famille des TLRs qui reconnaissent les PAMPS (pathogen-associated molecular patterns) ou les DAMPS (damage-associated molecular patterns)<sup>248</sup>.



Ces facteurs hypersensibilisent le neurone nociceptif de différentes façons :

- Certains facteurs tels que les EAOs, les protons, les lipides sont capables d'interagir directement, de manière allostérique, avec les canaux sensibles aux stimuli nocifs et d'en modifier leur fonctionnement<sup>249,242,250,251</sup>. Ainsi, l'acidification du milieu, la production d'EAOs ou la libération de médiateurs lipidiques activent des canaux ASICs et TRPV1,
- D'autres facteurs exercent leurs effets *via* la liaison à leur propre récepteur. Celle-ci peut entraîner, par phosphorylation, une modification soit de l'excitabilité du neurone nociceptif (par la régulation du fonctionnement des canaux sodiques voltage-dépendants), soit du seuil d'activation des canaux sensibles à un ou plusieurs stimuli nocifs<sup>239</sup>. La phosphorylation NGF-dépendante du TRPV1 induit, par exemple, une hyperalgésie thermique<sup>252</sup>. Le récepteur activé peut aussi interagir directement avec le/les canaux sensibles aux stimuli nociceptifs et entraîner une modification de leur fonctionnement (couplage entre le récepteur B2 à la bradykinine et le canal TRPA1<sup>243</sup>).

Enfin, parallèlement à cette sensibilisation périphérique, des facteurs pro-inflammatoires peuvent générer des signaux qui sont transportés de manière rétrograde jusqu'au corps cellulaire du neurone nociceptif où ils vont induire des modifications d'expression des gènes codant pour des neuropeptides (substance P, CGRP), des neurotrophines (BDNF), des canaux (canaux sodiques, canaux TRP...) ou des récepteurs<sup>253</sup>. L'inflammation *via* le NGF augmente, ainsi, le niveau d'expression des récepteurs  $\mu$  aux opiacés, induisant donc aussi un effet analgésique parallèlement à un effet pro-algésique sur le canal TRPV1<sup>254</sup>, tout comme l'IL-1 augmente l'expression du récepteur  $\kappa$ <sup>255</sup>.

*La nociception (et sa perception) constitue un signal d'alarme qui protège l'organisme en déclenchant des réactions qui ont pour finalité de diminuer la cause qui les a suscitées et d'en limiter les conséquences. Ce système nociceptif peut être activé par un grand nombre de variété de stimuli (mécanique, électrique, chimique, thermique) dont le caractère commun semble être la forte intensité qui renseigne sur la menace perturbant l'intégrité du corps. Lors d'une lésion tissulaire, les nocicepteurs sont activés par de multiples stimuli dont les cytokines, des médiateurs lipidiques ou les EAOs produits par les cellules immunitaires. Voyons dès à présent comment ce message nociceptif peut être modulé par les opioïdes.*





## II. Les opioïdes

Les opiacés sont des alcaloïdes, dérivés de l'opium et agissant sur les récepteurs aux opiacés (*cf chapitre 3, paragraphe II, B*). Les opioïdes ont une action similaire à celle des opiacés sur les récepteurs aux opiacés sans être, chimiquement, apparentés à l'opium. Qu'ils soient naturels ou de synthèse, les opiacés et/ou les opioïdes sont utilisés en médecine pour leur puissante action analgésique, mais aussi comme anesthésiants (action sédatrice), antitussifs et anti-diarrhéiques.

### A. Les ligands des récepteurs aux opioïdes

#### *1. Les opiacés*

La morphine est le premier ligand opiacé identifié par l'homme et est considérée comme la référence à laquelle sont comparés tous les autres analgésiques en termes d'efficacité. Il s'agit d'un alcaloïde extrait de l'opium, lui-même obtenu à partir du latex du pavot (*papavus somniferum*), plante cultivée pour ses propriétés analgésiques et euphorisantes depuis des millénaires (4 000 avant J-C). Néanmoins, la morphine possède de nombreux effets secondaires (nausées, constipation, vomissements, somnolence, troubles cardio-respiratoires...) et induit des phénomènes d'accoutumance et de tolérance entraînant une prise de doses croissantes et, à terme, une dépendance physique.

Malgré ces inconvénients, la forte analgésie produite par la morphine a encouragé le développement d'autres molécules telles que l'héroïne (1874, Charles Robert Alder Wright). La structure identique de tous ces composés suggéra que leurs effets passaient par une liaison à un / des récepteurs au niveau du système nerveux central <sup>256</sup>. Ainsi, comme nous le verrons plus tard, trois récepteurs dits « classiques » ont été rapidement identifiés : les récepteurs  $\mu$ ,  $\kappa$  et  $\delta$  <sup>257</sup>.

De nos jours, encore, les dérivés de l'opium représentent les principaux composés analgésiques (codéine, méthadone, buprénorphine, fentanyl, ...).

Il est important de noter que plusieurs études ont montré que la morphine est un opiacé endogène c'est-à-dire naturellement produit dans l'organisme : elle a, en effet, été retrouvée dans le cerveau et d'autres organes de plusieurs mammifères dont la souris et l'homme <sup>258,259,260,261,262</sup>. Elle pourrait ainsi être synthétisée et

Précurseur	Peptides opioïdes	Structure
Pro-enképhaline	Met-enképhaline	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe</b> -Met
	Met-enképhaline Arg <sup>6</sup> -Gly <sup>7</sup> -Leu <sup>8</sup> ou octapeptide	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe</b> -Met-Arg-Gly-Leu
	Met-enképhaline Arg <sup>6</sup> -Phe <sup>7</sup> ou heptapeptide	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe</b> -Met-Arg-Phe
	Leu-enképhaline	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe</b> -Leu
Pro-opiomélanocortine	β-endorphine	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe</b> -Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Val-Lys-Asn-Ala-His-Lys-Gly-Gln
	γ-endorphine	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe</b> -Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu
Pro-dynorphine	Dynorphine A (1-8)	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe</b> -Leu-Arg-Arg-Ile
	Dynorphine A (1-17)	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe</b> -Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln
	Dynorphine B	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe</b> -Leu-Arg-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr

**Figure 36 : Les opioïdes endogènes et leurs peptides**

En **rouge**, les acides aminés communs à l'ensemble des peptides opioïdes.

sécrétée par les cellules chromaffines de la médullo-surrénale et les cellules immunitaires<sup>263,261</sup>. Chez l'homme, il a également été montré qu'après chirurgie et en absence de tout traitement avec un opiacé, de la morphine est retrouvée au niveau plasmatique à des concentrations suffisantes pour activer les récepteurs  $\mu$ <sup>264-265</sup>.

## 2. Les ligands opioïdes endogènes

Les premiers ligands opioïdes endogènes ont été découverts en 1975 à la suite de l'identification de sites de liaison pour la morphine dans le cerveau<sup>266,267</sup>. La méthionine-enképhaline (Met-enképhaline : Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) et la leucine-enképhaline (Leu-enképhaline : Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu), aux propriétés identiques à la morphine ont à la suite été purifiées et isolées<sup>268</sup>. Depuis ces travaux pionniers, plus d'une vingtaine de peptides opioïdes endogènes a été décrite et regroupée en 3 grandes familles : les enképhalines, les dynorphines, les endorphines. Ces peptides possèdent quasiment tous l'enchaînement d'acides aminés « Tyr-Gly-Gly-Phe » et dérivent de précurseurs codés par des gènes différents (pro-enképhaline, pro-opiomélanocortine, pro-dynorphine) (*Fig. 36*). Grace à différentes endopeptidases, les précurseurs sont clivés pour donner des peptides opioïdes de nature et d'activité différentes.

### a) Les enképhalines

Le gène de la pro-enképhaline (PENK) code pour un pré-propeptide de 267 acides aminés<sup>269</sup>. Ce pro-peptide contient 4 copies de Met-enképhaline ainsi qu'une copie de Leu-enképhaline, une copie de Met-enképhaline-Leu<sup>8</sup> (ou heptapeptide) et une copie de Met-enképhaline-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup> (ou octapeptide) (*Fig. 36*). Chacune des copies est flanquée de part et d'autre de doublets basiques (Arg-Arg, Lys-Lys ou Lys-Arg), permettant l'action des pro-hormones convertases<sup>270</sup>. La dégradation des enképhalines se fait par les aminopeptidases-N<sup>271</sup> et des enképhalinases<sup>272</sup>. Celle-ci conduit à la « production » d'acides aminés qui peuvent être, à leur tour, précurseur d'autres neurotransmetteurs (dopamine, noradrénaline), compliquant ainsi l'étude des effets des enképhalines<sup>273</sup>.

Il convient déjà de noter, qu'à côté de leurs effets analgésiques médiés par les récepteurs aux opiacés localisés dans le système nerveux, certaines enképhalines



sont capables d'exercer des effets en périphérie sur la réponse immunitaire, y compris des effets bactéricides <sup>274</sup>. Il est à noter que la met-enképhaline peut également jouer le rôle de facteur de croissance : on l'appelle alors OGF (Opioid Growth Factor) <sup>275</sup>.

#### b) Les endorphines

Tout comme pour PENK, le gène de la pro-opiomélanocortine (POMC) code pour un précurseur composé de 267 acides aminés. L'action des pro-hormones convertases conduit à la synthèse de  $\beta$ -endorphine, d'ACTH (ou hormone corticotrope) et d' $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -MSH (Melanocyte Stimulating Hormone) <sup>276</sup> (*Fig. 36*). La  $\beta$ -endorphine peut être ultérieurement clivée en  $\beta$ -endorphine (1-21) ou (1-27) mais également en  $\gamma$ -endorphine (1-17) et  $\alpha$ -endorphine (1-16), ces deux dernières ayant une affinité pour les récepteurs aux opiacés plus faible que la  $\beta$ -endorphine <sup>277</sup>. Les endorphines sont généralement inactivées par acétylation <sup>278</sup>.

#### c) Les dynorphines

Le gène de la prodynorphine (PDYN) code pour un précurseur de 245 acides aminés. Ce dernier est clivé en Leu-enképhaline et en dynorphines A et B (*Fig. 36*). Ce précurseur est synthétisé quasi-exclusivement dans le cerveau. Les dynorphines peuvent être dégradées par l'activation d'aminopeptidases <sup>279</sup>.

### 3. *Quelles sont les cellules qui synthétisent et libèrent ces opioïdes endogènes?*

La principale source d'opioïdes, dans l'organisme, est le tissu nerveux. En effet, les gènes codant pour PENK, POMC et PDYN sont très fortement exprimés dans le système nerveux central. Cette expression est alors neuronale. Ces gènes gardent néanmoins un profil d'expression spécifique (une population neuronale ne synthétise qu'un seul de ces trois précurseurs). Les neurones enképhalinergiques sont les plus abondants et sont retrouvés dans un grand nombre de structures nerveuses (cortex cérébral, amygdale, hippocampe, striatum, hypothalamus et thalamus, corne dorsale de moelle épinière). On retrouve dans une grande partie de



ces régions anatomiques, des populations neuronales exprimant la PDYN. Concernant la POMC, le profil d'expression est beaucoup plus restreint puisque seules deux populations neuronales à POMC ont été identifiées : une population de neurones au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus et une population neuronale au niveau du noyau du tractus solitaire dans le bulbe rachidien <sup>280</sup>.

A côté de cette production nerveuse (cérébrale et/ou médullaire), il y a d'autres tissus capables de synthétiser et libérer des opioïdes. Ainsi, les cellules chromaffines de la médullo-surrénale sécrètent des enképhalines et des dynorphines en réponse à une activation sympathique lors d'un stress. On retrouve également une production d'opioïdes par le tractus gastro-intestinal (entérocytes) et la peau (kératinocytes) <sup>281,282,283</sup>. Enfin, les cellules immunitaires peuvent produire les trois opioïdes endogènes <sup>284</sup> (*cf paragraphe III, A*).

## **B. Les récepteurs aux opiacés et opioïdes**

### *1. Historique*

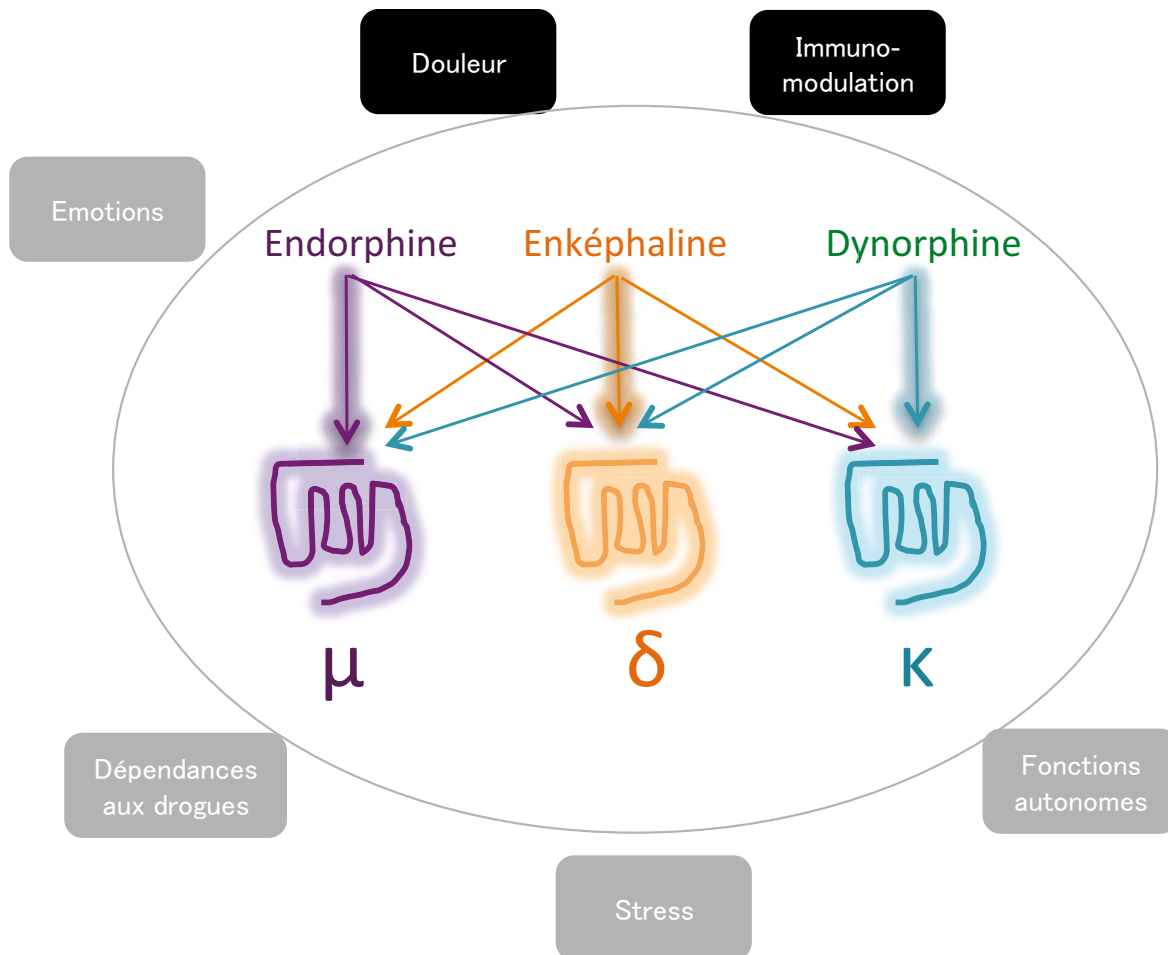
En 1973, deux récepteurs aux opioïdes sont identifiés sur la base de leurs réponses à différents ligands : le récepteur  $\mu$  (« m » en grec pour morphine) et le récepteur  $\kappa$  (« K » en grec pour kétocyclazocine). Le récepteur  $\delta$  sera découvert trois ans plus tard et ainsi nommé car retrouvé en grande quantité dans le canal déférent murin. C'est le clonage de ce dernier chez la souris qui a permis celui des récepteurs  $\mu$  et  $\kappa$  murins par homologie de séquence <sup>285,286</sup>.

### *2. Structure des récepteurs*

Ces récepteurs, codés par des gènes différents, sont très conservés au cours de l'évolution, puisqu'ils sont présents chez tous les vertébrés (chez qui ils ont été cherchés) <sup>287</sup>. Les récepteurs  $\mu$ ,  $\delta$  et  $\kappa$  sont respectivement codés par les gènes *ormp1*, *opr1* et *ork1*, situés sur les chromosomes 10, 4, 1 (chez la souris) ou 6, 1, 8 (chez l'homme) <sup>288,289,290</sup>.

Il existe une littérature abondante démontrant l'existence de différentes isoformes issues d'épissages alternatifs de ces récepteurs. Le récepteur  $\mu$  présente au moins 20 variants chez la souris et au moins 6 chez l'homme <sup>291</sup>. Ces variants se caractérisent par des affinités différentes pour les ligands et par la mise en jeu de cascades de signalisation différentes (*cf paragraphe II. B.4*).

D'un point de vue leur structure, ces 3 types de récepteurs font partie de la



**Figure 37 : Représentation schématique du système opioïde endogène**

La liaison ligand / récepteur aboutit à la modulation de l'activité des cellules portant les récepteurs, en modulant les fonctions physiologiques : fonctions autonomes, douleur, modulation de la réaction immunitaire, stress et émotions (en noir, les fonctions que nous aborderons dans le manuscrit).

La particularité du système opioïde est qu'il possède plusieurs ligands qui lient seulement trois récepteurs. L'endorphine se lie principalement au récepteur  $\mu$ , l'enképhaline au récepteur  $\delta$  et la dynorphine au récepteur  $\kappa$ .



superfamille des RCPG (Récepteurs couplés à une protéine G) <sup>292</sup>. Ils partagent entre eux 61% d'homologie, avec 76% d'homologie au niveau des 7 domaines transmembranaires <sup>293</sup>.

Les trois familles de peptides opioïdes présentées au paragraphe II-A-2 (enképhalines, endorphines et dynorphines) se lient aux trois types de récepteurs avec des affinités différentes : de manière générale, les dynorphines ont une meilleure affinité pour les récepteurs  $\kappa$ , les enképhalines pour les récepteurs  $\delta$  et les endorphines pour les récepteurs  $\mu$  <sup>294</sup> (*Fig. 37*).

### 3. Localisation de ces récepteurs

Les récepteurs aux opioïdes ( $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\delta$ ) sont exprimés par un grand nombre de cellules de l'organisme. Néanmoins, ils restent prépondérants au niveau neuronal, avec des différences de localisation selon les types de récepteurs. De manière générale, la localisation de ces récepteurs se superpose à celle des neurones exprimant PENK, POMC ou PDYN.

Parallèlement à cette localisation dans le système nerveux central, les récepteurs aux opioïdes sont retrouvés en périphérie, au niveau des terminaisons des neurones nociceptifs eux-mêmes, dans le tractus gastro-intestinal (entérocytes), dans la peau (kératinocytes, mélanocytes, fibroblastes), ainsi que sur les cellules immunitaires (*cf. paragraphe III, B*) <sup>295,296,297</sup>.

### 4. Cascades intracellulaires de signalisation

Les trois types de récepteur sont majoritairement couplés à des protéines G de type  $\alpha_i$  ou  $\alpha_o$  <sup>292</sup>. Leur activation entraîne donc une inhibition de l'adénylyl cyclase et une diminution de la concentration intracellulaire en AMPc <sup>298,299</sup>. A terme, cela conduit, par des processus de phosphorylation, à une inhibition de canaux calciques voltage-dépendants et/ou à une activation de canaux potassiques GIRK (G protein regulated inward rectifying  $K^+$  channels), conduisant dans les deux cas à l'inhibition de la cellule <sup>292</sup> (*Fig. 38*).

Selon les isoformes des récepteurs, un couplage avec d'autres protéines G a été décrit, notamment pour le récepteur  $\mu$  <sup>300</sup>. Il est intéressant de noter que ce couplage avec différentes protéines G peut expliquer l'effet paradoxal de la morphine qui peut être observé dans certaines situations : à faible dose (de l'ordre



du nM), la morphine peut être excitatrice (et entraîner un effet hyperalgésique) alors que pour des doses plus importantes, elle est inhibitrice (effet analgésique attendu). Certaines équipes expliquent cet effet paradoxal à faible dose par un couplage du récepteur avec une protéine G de type  $\alpha_s$  (conduisant à l'activation de l'adénylyl cyclase)<sup>286,301,302</sup>. D'autres équipes décrivent toujours à faible dose, la mise en jeu d'une cascade de transduction IP3-dépendante excitatrice<sup>303</sup>.

Enfin, il a été montré qu'à côté d'une régulation de l'adénylyl cyclase, les MAP kinases pouvaient être également activées par l'activation des récepteurs aux opioïdes. Cette voie de signalisation serait mise en jeu par les opiacés/opioïdes dans le contrôle de la croissance cellulaire, la différenciation, la migration ou l'apoptose<sup>304</sup>.

Enfin, l'activation de la voie des MAP kinases, mais également des voies AKT/ERK pourraient également être impliquées dans les phénomènes de tolérance aux opiacés<sup>304,305</sup>.

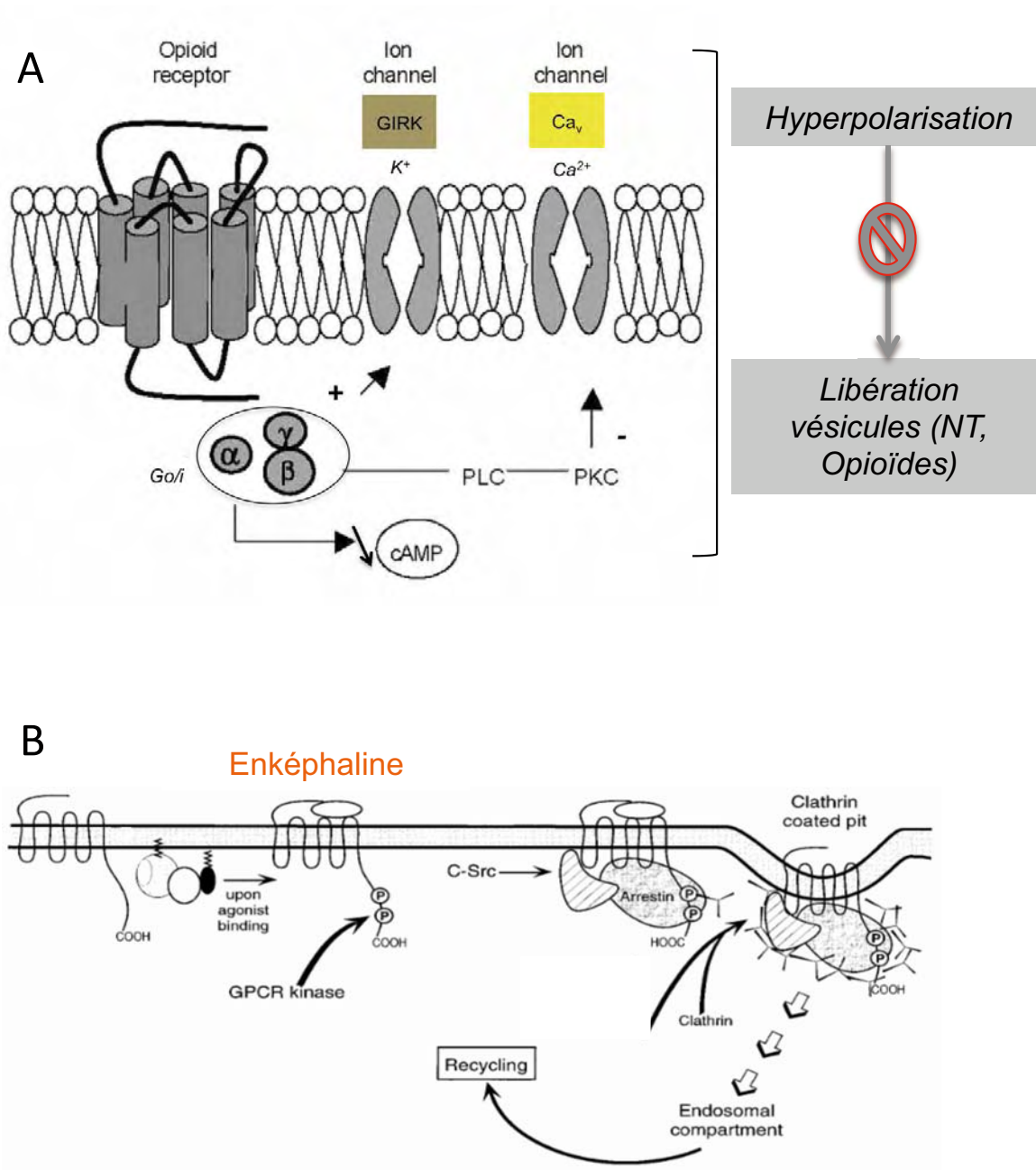
### *5. Dimérisation des récepteurs aux opioïdes*

Il est aujourd'hui admis que les RCPG peuvent s'homodimériser ou s'hétérodimériser permettant des effets différents. La dimérisation des récepteurs aux opioïdes existe et semble importante. Par exemple, la dimérisation des récepteurs  $\mu$  et  $\delta$  permet l'activation de la protéine G de type  $\alpha_z$ , entraînant une cascade de signalisation différente de celle des récepteurs isolés<sup>306</sup>. Sous forme hétérodimérique, les récepteurs  $\mu$  sont activés avec une faible concentration d'agonistes du récepteur  $\delta$ . L'analgésie induite par la morphine peut également être potentialisée par utilisation d'un antagoniste du récepteur  $\delta$ , ouvrant ainsi une nouvelle voie thérapeutique dans la pharmacologie de la douleur<sup>307</sup>.

Les récepteurs  $\mu$  peuvent également s'hétérodimériser avec d'autres RCPG « non opiacés » : le récepteur CCR5 (Récepteur aux chimiokines)<sup>308</sup>, le récepteur SST2 à la somatostatine<sup>309</sup>, les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques<sup>310</sup>, le récepteur NK1 à la substance P<sup>311</sup>.

### *6. Désensibilisation des récepteurs*

Les RCPGs sont connus pour leur désensibilisation, en réponse à une action prolongée ou répétée de l'agoniste sur son récepteur. Cette désensibilisation se



**Figure 38 : Activation et désensibilisation du récepteur aux opioïdes mu**

**A. Activation du récepteur** : La fixation d'un ligand agoniste au récepteur  $\mu$  aux opioïdes active la protéine Gq/i qui inhibe l'activité de l'adénylate cyclase ayant pour conséquence une baisse du taux d'AMPc cellulaire. Les canaux calciques sont fermés et les canaux potassiques GIRK ouverts, conduisant à l'hyperpolarisation de la membrane cellulaire et à la diminution la libération de neurotransmetteurs (NT).

*Adapté de Stein, 2013*

**B. Désensibilisation du récepteur** : Le récepteur activé est phosphorylé par GRK (GPCR kinase). Les  $\beta$ -arrestines se lient aux récepteurs phosphorylés et recrutent la clathrine pour que les récepteurs soient internalisés soit pour être dégradés, soit pour être recyclés à la membrane. La plupart des agonistes des récepteurs aux opioïdes active la voie de désensibilisation (excepté la morphine).

*Adapté de Williams, 2001*

traduit par une internalisation du récepteur et une dégradation ou un ré-adressage à la membrane. De manière générale, la désensibilisation nécessite la phosphorylation par une GRK (G protein coupled Receptors Kinase), de résidus localisés dans les boucles intracellulaires. Une fois phosphorylé, le récepteur est découplé de la protéine G par les  $\beta$ -arrestines puis endocyté grâce au recrutement de protéines comme la clathrine ou la  $\beta$ -adaptine.

Comme les autres RCPGs, les récepteurs aux opiacés sont sujets à des phénomènes de désensibilisation. Concernant la phosphorylation des récepteurs, il a été montré que l'inhibition des GRK inhibait bien la phosphorylation des récepteurs  $\delta$  <sup>312</sup>. Cependant, la phosphorylation du récepteur  $\mu$  est différente en fonction de l'agoniste et du modèle cellulaire <sup>313</sup>. Ainsi, la morphine n'induit pas de désensibilisation du récepteur  $\mu$  dans les cellules HEK-293 alors qu'elle l'induit dans les neurones de striatum chez le rat. Ce même récepteur  $\mu$  est d'avantage phosphorylé (désensibilisation plus importante) lorsqu'il est activé par le DAMGO (agoniste de synthèse des récepteurs  $\mu$ ) que par la morphine <sup>313</sup>.

Concernant l'internalisation des récepteurs, il a été montré que l'inactivation des  $\beta$ -arrestines diminuait de manière significative l'internalisation des récepteurs  $\mu$  alors que leur surexpression augmentait l'internalisation du récepteur <sup>313</sup> (*Fig. 38*).

### **C. Effets analgésiques des opioïdes**

Les opiacés et les opioïdes exercent leurs effets analgésiques au niveau central mais aussi au niveau périphérique. Il est important de noter que l'injection d'agonistes des récepteurs aux opioïdes en condition non inflammatoire n'a aucun effet sur le seuil de sensibilité du nocicepteur. Lors de la réponse inflammatoire, le pH acide et l'augmentation de la température locale permettent de rompre la barrière périneurale (composé de cellules endothéliales, d'une lame basale et cellules gliales, entourant les axones du système nerveux périphérique). De ce fait, l'accès des ligands opioïdes sur leurs récepteurs est facilité et entraînera une diminution du signal nociceptif <sup>314</sup>.

Au niveau central, c'est la « remontée » d'information nociceptive au travers de la moelle épinière et de l'encéphale qui déclenche la libération d'opioïdes par les neurones PENK, PDYN et POMC au niveau de différentes régions anatomiques (*cf*



*paragraphe I, D*). Cette libération d'opioïdes entraîne l'activation de voies descendantes capables de diminuer la transmission de l'information nociceptive. La libération d'enképhalines par de petits interneurons au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière a ainsi pour conséquence de diminuer la quantité de neurotransmetteurs libérés par la terminaison synaptique (glutamate, substance P) du neurone nociceptif mais aussi d'inhiber le neurone de second ordre, point de départ des voies ascendantes nociceptives (*Fig. 35*).

Au niveau des tissus périphériques, les opioïdes sont aussi capables d'exercer un effet analgésique en se liant aux récepteurs présents sur les terminaisons périphériques des neurones nociceptifs. La découverte de cet effet périphérique date des années 1990s : chez l'homme, l'injection de naloxone (antagoniste des récepteurs  $\mu$  aux opioïdes) dans le genou opéré augmente fortement la douleur, suggérant l'existence d'une activation endogène des récepteurs  $\mu$  et/ou  $\delta$ . Cependant, on ne peut pas s'affranchir d'un effet central de la naloxone puisqu'elle est capable de franchir la barrière hémato-encéphalique. Depuis, il a été largement démontré que, lors d'une lésion tissulaire ou d'une réaction inflammatoire, des opioïdes agissent (naloxone méthiodide, ne traversant pas la barrière hémato-encéphalique) ou sont libérés localement afin de diminuer le message nociceptif <sup>315,316</sup>. Ces opioïdes (notamment des enképhalines) peuvent être libérés par les terminaisons des neurones nociceptifs eux-mêmes, en réponse à un stimulus nocif ou à des médiateurs pro-inflammatoires (*cf paragraphe I, D*) <sup>317-319</sup>. Par ailleurs, une quantité importante d'opioïdes est libérée par les cellules immunitaires recrutées sur la zone de lésion. Nous reviendrons sur cette libération dans la dernière partie de ce chapitre (*cf paragraphe III, A*).

Comme au niveau central, l'activation des récepteurs aux opiacés présents sur les terminaisons périphériques des neurones nociceptifs conduit à l'inhibition par hyperpolarisation du neurone nociceptif et donc à la diminution voire la suppression du message nociceptif (*Fig. 35*).

Il est tout de même important de noter que seul le récepteur  $\delta$  semble être impliqué dans l'effet analgésique périphérique des opioïdes sur les neurones nociceptifs, puisque seule la souris déficiente pour ce récepteur dans les fibres nerveuses afférentes périphériques ne présente pas de diminution de la douleur suite à une inflammation périphérique <sup>320</sup>.





Dans un contexte inflammatoire (faisant suite à la lésion d'un tissu par exemple), la synthèse des récepteurs aux opiacés par les neurones nociceptifs est stimulée. Ils sont ensuite acheminés à l'extrémité des terminaisons des neurones nociceptifs <sup>284</sup>. Ainsi, l'injection d'adjuvant de Freund (modèle d'inflammation) dans la patte d'un rat, augmente l'expression du récepteur  $\mu$  (2h puis 96h après l'injection) <sup>254</sup> ainsi que celle du récepteur  $\kappa$  (12h) <sup>255</sup>. Cette augmentation de transcription est dépendante de i) de l'activité électrique des fibres afférentes <sup>254</sup> et ii) de l'action des cytokines pro-inflammatoires <sup>255</sup>. Il a également été montré que les molécules libérées en cas de lésion / inflammation augmentaient la vitesse de transport des récepteurs  $\mu$ ,  $\kappa$  et  $\delta$  <sup>255, 321</sup> vers les terminaisons afférentes périphériques.

L'ensemble de ces mécanismes permet donc i) une augmentation du nombre de récepteurs aux opiacés sur les fibres nerveuses, ii) un nombre de fibres possédant les récepteurs plus important *via* la signalisation à la bradykinine libérée pendant l'inflammation <sup>322</sup>, iii) un couplage aux protéines G de type  $\alpha_o/\alpha_i$  des récepteurs aux opiacés facilité durant les phénomènes d'inflammation <sup>323</sup>. Cela a pour conséquence une augmentation des propriétés anti-nociceptives des ligands opioïdes durant l'inflammation.

*Nous venons de voir que le système opioïde est complexe (multiples opioïdes endogènes pouvant agir sur de multiples récepteurs aux opioïdes). De plus, la majorité des cellules de l'organisme est dotée de récepteurs aux opioïdes, rendant le système ligand-récepteurs aux opioïdes redondant. Les principales cellules capables de libérer des opioïdes endogènes sont les neurones mais également les cellules inflammatoires de l'immunité innée et adaptative. Voyons dès à présent les liens qui existent entre opioïdes et cellules immunitaires puis entre opioïdes et réparation tissulaire.*



### **III. Opiïdes et réaction inflammatoire : implication dans les processus de cicatrisation et/ou de régénération ?**

#### **A. Les cellules immunitaires synthétisent et libèrent des opioïdes**

Comme décrit précédemment, les cellules immunitaires sont capables de synthétiser et sécréter des opioïdes dans un contexte inflammatoire. Cette capacité des cellules immunitaires à produire des opioïdes donne lieu à de nombreuses publications. La présence des ARNm de PENK, PDYN et POMC a en effet été décrite dans la plupart des cellules d'origine hématopoïétique chez le rongeur et chez l'Homme, en condition basale ou après induction par des facteurs pro-inflammatoires<sup>324</sup>.

##### *1. Les cellules de l'immunité innée*

Après lésion, les neutrophiles et macrophages sont les premières cellules recrutées lors de la phase inflammatoire en réponse à une agression tissulaire. Ce recrutement est en partie dû aux chimiokines qui guident leur migration vers la zone de lésion ainsi qu'à la libération de substance P et de CGRP par les terminaisons périphériques des neurones nociceptifs activés par les différents stimuli nocifs et/ou les molécules inflammatoires (*cf paragraphe I,A et I,D*). Il a été montré que si ces cellules n'étaient pas recrutées sur la zone de lésion, la douleur inflammatoire était exacerbée suggérant un effet analgésique dû à leur présence<sup>325,326</sup>. Les neutrophiles et macrophages, en conditions inflammatoires, sont donc décrites comme étant les premières cellules immunitaires à produire des opioïdes endogènes, contenus dans des stocks vésiculaires cytoplasmiques<sup>327</sup>. Ainsi, le recrutement de ces cellules sur la zone de lésion est indispensable à l'analgésie endogène périphérique<sup>327</sup>.

Les médiateurs pro-inflammatoires, qui sont à l'origine du recrutement et de l'activation des cellules immunitaires innées, sont également à l'origine de la libération d'opioïdes. En effet, Cabot et coll ont mis en évidence que l'activation du récepteur à l'IL-1 $\beta$  induisait la libération d'opioïdes endogènes par les macrophages<sup>328</sup>.

Enfin, il faut savoir que les PAMPs produits par les bactéries induisent également la libération d'opioïdes par les neutrophiles et macrophages à l'origine



d'une hypersensibilité des nocicepteurs (activation du message nociceptif) tout en stimulant la libération d'opioïdes endogènes par les cellules <sup>329</sup>. L'activation du récepteur TLR-4 (récepteur au LPS) induit également la sécrétion de  $\beta$ -endorphine par les macrophages, 4 jours après le début de l'inflammation <sup>330</sup>.

## *2. Les cellules de l'immunité adaptative*

Lors de la phase inflammatoire tardive, les lymphocytes T sont également capables de produire des opioïdes à condition d'avoir été activés, notamment par l'IL-4 <sup>328,331,332,333</sup>. Récemment, Boué et coll. ont montré dans un modèle de colite inflammatoire, que plus le nombre de lymphocytes T était important, plus la réponse analgésique, *via* la libération d'enképhalines, était importante <sup>334</sup>. De la même façon, l'injection locale de CXCL2 (chimiochine libérée durant la phase inflammatoire) dans un modèle d'inflammation de la patte chez le rat réduit le message nociceptif *via* une sécrétion accrue d'opioïdes <sup>284</sup>. Le CRF et la noradrénaline sont aussi capables de stimuler la sécrétion d'opioïdes par les lymphocytes <sup>324</sup>.

*On est donc ainsi face à une situation paradoxale puisque, lors d'une lésion tissulaire ou d'une agression, les cellules immunitaires libèrent à la fois des molécules initiatrices d'un message nociceptif (cf paragraphe I-D), mais aussi des opioïdes dont « l'effet » est de diminuer ce message.*

*Nous venons de voir que les opioïdes étaient un lien entre cellules immunitaires et innervation puisque les cellules immunitaires produisent des ligands opioïdes capables de moduler la perception douloureuse. Nous allons voir que les opioïdes sont également capables de moduler la réaction immunitaire.*

## **B. Les opioïdes modulent l'inflammation**

### *1. Via le récepteur $\kappa$*

Le récepteur  $\kappa$  est présent dans toutes les cellules immunitaires, qu'elles soient matures ou immatures <sup>335,336</sup>.

L'activation du récepteur  $\kappa$  augmente la sécrétion d'IL-1 $\beta$  ou la production d'anions superoxydes par les macrophages <sup>337,338</sup>. Par ailleurs, les souris déficientes pour le récepteur  $\kappa$  produisent, après immunisation, une grande quantité d'IgM, IgG1 et



IgG2, suggérant un effet inhibiteur de ce récepteur sur la réponse immunitaire humorale. Enfin, l'activation du récepteur  $\kappa$  sur les lymphocytes stimule leur prolifération<sup>335</sup>.

### 2. Via le récepteur $\delta$

Comme le récepteur  $\kappa$ , le récepteur  $\delta$  est exprimé par toutes les cellules immunitaires<sup>335</sup>. Il a été montré que l'activation du récepteur  $\delta$  sur les lymphocytes T diminuait leur prolifération. L'activation du récepteur  $\delta$  sur les monocytes serait, elle, responsable de leur migration vers la zone de lésion. En effet, le DPDPE (agoniste sélectif des récepteurs  $\delta$ ) augmente les processus d'adhésion  $\alpha_5\beta_1$ -intégrines-dépendants des monocytes sanguins aux cellules endothéliales, alors que le naltrindole (un antagoniste sélectif des récepteurs  $\delta$ ) la diminue<sup>335</sup>.

### 3. Via le récepteur $\mu$

Le récepteur  $\mu$  est présent sur les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes T, B et les granulocytes<sup>335</sup>. L'application de DAMGO (agoniste sélectif des récepteurs  $\mu$ ) sur des monocytes humains augmente à la fois la libération de MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), de RANTES et d'IP-10 (INF- $\gamma$  inducible protein-10) par ces cellules, conduisant au recrutement d'autres monocytes sur la zone de lésion<sup>339</sup>.

La morphine, en agissant sur le récepteur  $\mu$  diminue la prolifération des lymphocytes T *via* une augmentation de l'activité cytotoxique des lymphocytes NK<sup>335</sup>.

L'analyse de ces résultats montre qu'il est difficile de conclure sur un effet pro- ou anti-inflammatoire des opioïdes. En effet, même si on qualifie l'effet des opioïdes comme étant en général « immuno-suppresseur », il est important de noter que l'action des opioïdes sur les cellules immunitaires est dépendante du type cellulaire utilisé, de la dose ainsi que de la durée du traitement.

*Après une lésion, les cellules immunitaires, sont à la fois i) capables d'activer les nocicepteurs afférents sensoriels en libérant des EAOS / cytokines / médiateurs lipidiques (agissant directement sur leur récepteur spécifique présent sur les terminaisons libres périphériques) mais sont également capables ii) d'inhiber ces*





*mêmes nocicepteurs en sécrétant des opioïdes qui se fixent sur les récepteurs aux opioïdes des terminaisons périphériques. La résultante de cette double action des cellules immunitaires dépendra donc de la balance activation / inhibition du nocicepteur.*

*Puisque les opioïdes agissent sur les cellules immunitaires et que les cellules immunitaires sont impliquées dans la réparation tissulaire, voyons dès à présent les études qui portent sur le lien opioïdes et réparation tissulaire.*

### **C. Opioïdes et cicatrisation**

Comme nous l'avons vu au chapitre 2, le contrôle de l'immunité est indispensable pour les processus de cicatrisation / régénération. Au regard des données présentées ci-dessus sur les relations étroites qui existent entre opioïdes et cellules immunitaires, on peut se poser la question du rôle joué par les opioïdes dans les processus de cicatrisation et/ou de régénération, d'autant plus que les opiacés font partie des molécules les plus prescrites en période post-opératoire afin de diminuer la/les douleur(s) liée(s) à la lésion ou à l'intervention chirurgicale.

Il y a malheureusement peu d'études qui ont évalué les effets de traitements analgésiques aux opiacés sur les processus de cicatrisation et ces études présentent des résultats contradictoires :

#### *1. Les opioïdes, accélérateurs de cicatrisation*

A faible, voire très faible concentration, quelques articles montrent que la morphine peut exercer une action pro-inflammatoire (augmentation d'iNOS dans les macrophages), stimuler l'angiogenèse (via l'activation de PDGF- $\beta$ )<sup>340</sup> et ainsi favoriser la cicatrisation de la peau du dos après biopsie chez le rat<sup>341</sup>. De la même façon, une cicatrisation cutanée altérée est observée chez les souris invalidées pour le récepteur  $\delta$ <sup>342</sup>. Il est possible que ces effets bénéfiques sur la cicatrisation soient dus à l'activation de cascades de signalisation intracellulaires particulières, notamment via l'activation des voies des MAPkinases<sup>340</sup> (*cf paragraphe II, B, 4*).



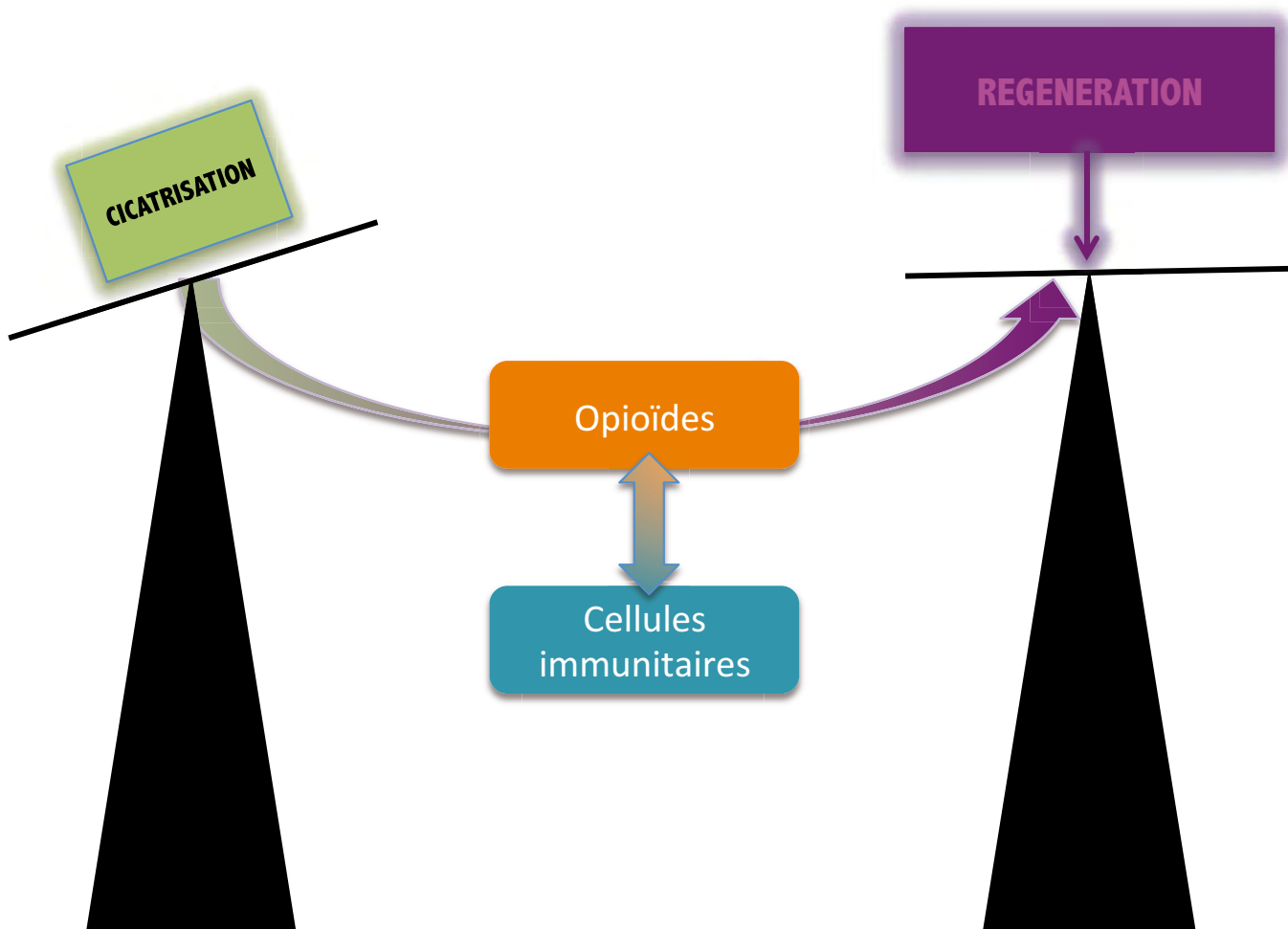
## 2. Les opioïdes, retardateurs de cicatrisation

Un plus grand nombre d'études montrent que les agonistes des récepteurs aux opioïdes (morphine) ont des effets délétères sur la réparation tissulaire, alors que les antagonistes accélèrent (naloxone, naltrexone) la réparation tissulaire. En effet, Rook et coll. montrent que l'utilisation de la morphine retarde la fermeture d'une plaie cutanée chez le rat <sup>343,344,345</sup>. Cet effet passe par une diminution de la sécrétion de substance P par les terminaisons des nocicepteurs.

Il faut savoir que, normalement, la libération de ce neuropeptide induit une vasodilatation accompagnée d'une augmentation de la perméabilité vasculaire permettant ainsi le recrutement de cellules immunitaires sur le site de lésion ainsi que la sécrétion par ces cellules de médiateurs pro-inflammatoires. La diminution de la sécrétion de substance P entraîne donc une réaction inflammatoire locale amoindrie, impactant le processus de cicatrisation. Ce rôle négatif des opioïdes sur la cicatrisation est retrouvé dans d'autres modèles de lésion comme l'abrasion de la cornée ou la brûlure <sup>346,347</sup>. Ces résultats ont amené certaines équipes à tester l'effet bénéfique de traitements locaux à base d'antagonistes des récepteurs aux opioïdes (naltrexone) dans des contextes de cicatrisation difficile <sup>348-350</sup>. Les antagonistes des opioïdes semblent capables d'accélérer la cicatrisation, même si, *in fine*, il n'y a pas de différence dans le résultat final entre les animaux traités ou non <sup>351</sup>.

En conclusion, si l'implication des opioïdes sécrétés probablement par les cellules immunitaires et/ou par les neurones nociceptifs dans les processus de cicatrisation n'est pas à remettre en cause, d'autres études sont néanmoins nécessaires afin de définir précisément la période de la réaction inflammatoire pendant laquelle les opioïdes sont produits et donc peuvent agir, ainsi que les cellules impliquées dans cette réaction inflammatoire. En effet, concernant les études montrant que la morphine est pro-cicatrisante, la réponse inflammatoire est étudiée bien tardivement (8 jours après lésion). Nous avons vu dans le *chapitre II* qu'après lésion, les étapes pro-inflammatoires et anti-inflammatoires doivent être régulées dans le temps pour que la régénération ait lieu, c'est pourquoi il serait judicieux, de connaître l'état pro- et anti-inflammatoire à des temps précoces pour les modèles traités à la morphine.

Enfin, il est à noter que les doses utilisées pour l'effet bénéfique de la morphine sont des concentrations basses (basses par rapport aux doses de morphine utilisées pour diminuer la douleur post-opératoire) alors que l'effet anti-



**Figure 39 : Hypothèse de travail**

Les opioïdes, libérés par les cellules du tissu lésé (cellules nerveuses, cellules stromales, cellules immunitaires), vont moduler le recrutement et l'activation des cellules immunitaires. L'intensité et la durée de la phase inflammatoire va conditionner la réparation tissulaire en une cicatrisation (chez les mammifères) ou une régénération (chez les vertébrés inférieurs).

***Peut-on, en modulant l'activation des récepteurs aux opioïdes des cellules immunitaires, orienter la réparation tissulaire vers une régénération, chez les mammifères?***

régénérant de la morphine concerne des concentrations identiques à celles utilisées en thérapeutique. Ainsi, les effets contradictoires observés (pro- et anti-régénérant) de la morphine peuvent s'expliquer par i) des études sur les phases pro- et anti-inflammatoires non comparables entre les études, ii) des doses de morphine différentes et iii) des modèles *in vitro* / *in vivo* différents. Néanmoins, il semble donc que les agonistes aux récepteurs aux opioïdes, à des doses classiquement utilisées en post-opératoire, soient délétères pour une « bonne » réparation tissulaire.

*Pour conclure, les opioïdes sont impliqués dans la réparation tissulaire, malgré les conclusions contradictoires de la littérature. On sait également qu'il existe un lien intime entre cellules immunitaires et opioïdes : les cellules immunitaires sont à la fois capables de i) libérer des opioïdes après lésion et ii) moduler leur activité en réponse aux opioïdes. Enfin, les cellules immunitaires, en libérant des opioïdes peuvent moduler le message nerveux nociceptif.*

*Puisque nous avons vu dans le chapitre II, que l'activation des cellules immunitaires ainsi que de l'innervation étaient indispensables aux processus de régénération (vertébré inférieur, souris MRL), il apparaît aujourd'hui nécessaire d'étudier les relations entre opioïdes, cellules immunitaires et innervation chez le mammifère adulte, après lésion tissulaire (Fig. 39).*



OBJECTIFS

SCIENTIFIQUES

---





Longtemps considéré comme un tissu inerte, nous avons vu dans l'introduction que les TA sont des tissus aux multiples fonctions et localisations. Composés de différents types cellulaires (adipocytes, progéniteurs adipocytaires, cellules immunitaires), ces TA exercent des rôles indispensables à l'organisme : stockage et libération d'énergie sous forme de TG, adaptation au froid par production de chaleur, ... De ce fait, leur implication en physiopathologie ne cesse de s'accroître. Néanmoins, leur organisation à l'échelle tissulaire reste aujourd'hui très peu étudiée. Par ailleurs, depuis longtemps, ces TA sont considérés comme extrêmement plastiques. Cette plasticité montre néanmoins des limites quand on étudie la réponse de ces tissus à une ablation massive de type lipectomie (un tissu ne semble pas capable de « repousser ») ou leur comportement lorsqu'on les utilise en chirurgie reconstructrice.

Au cours de ma thèse, je me suis donc intéressée à l'organisation du TA ainsi qu'à sa plasticité après lésion.

Dans un premier temps, j'ai ainsi cherché à répondre à la question suivante : l'organisation d'un TA (le TA sous-cutané inguinal) est-elle liée à sa/ses fonctions ?

Dans un second temps, j'ai regardé s'il était possible, suite à une ablation massive du TA, de moduler par les opioïdes la réparation/régénération de ce tissu en modulant l'activité des cellules immunitaires et/ou stromales.

La partie « production scientifique » abordera donc successivement :

- Le lien entre l'organisation et la fonction tissulaire du TA inguinal en situation physiologique et physiopathologique (*Chapitre 1*)
- La mise en place du modèle de lipectomie chez les souris C57BL/6 et MRL ainsi que l'étude de l'implication des opioïdes au cours de la réparation tissulaire chez ces deux souches de souris (*Chapitre 2*)



PRODUCTIONS

SCIENTIFIQUES

---



# **Chapitre 1 :**

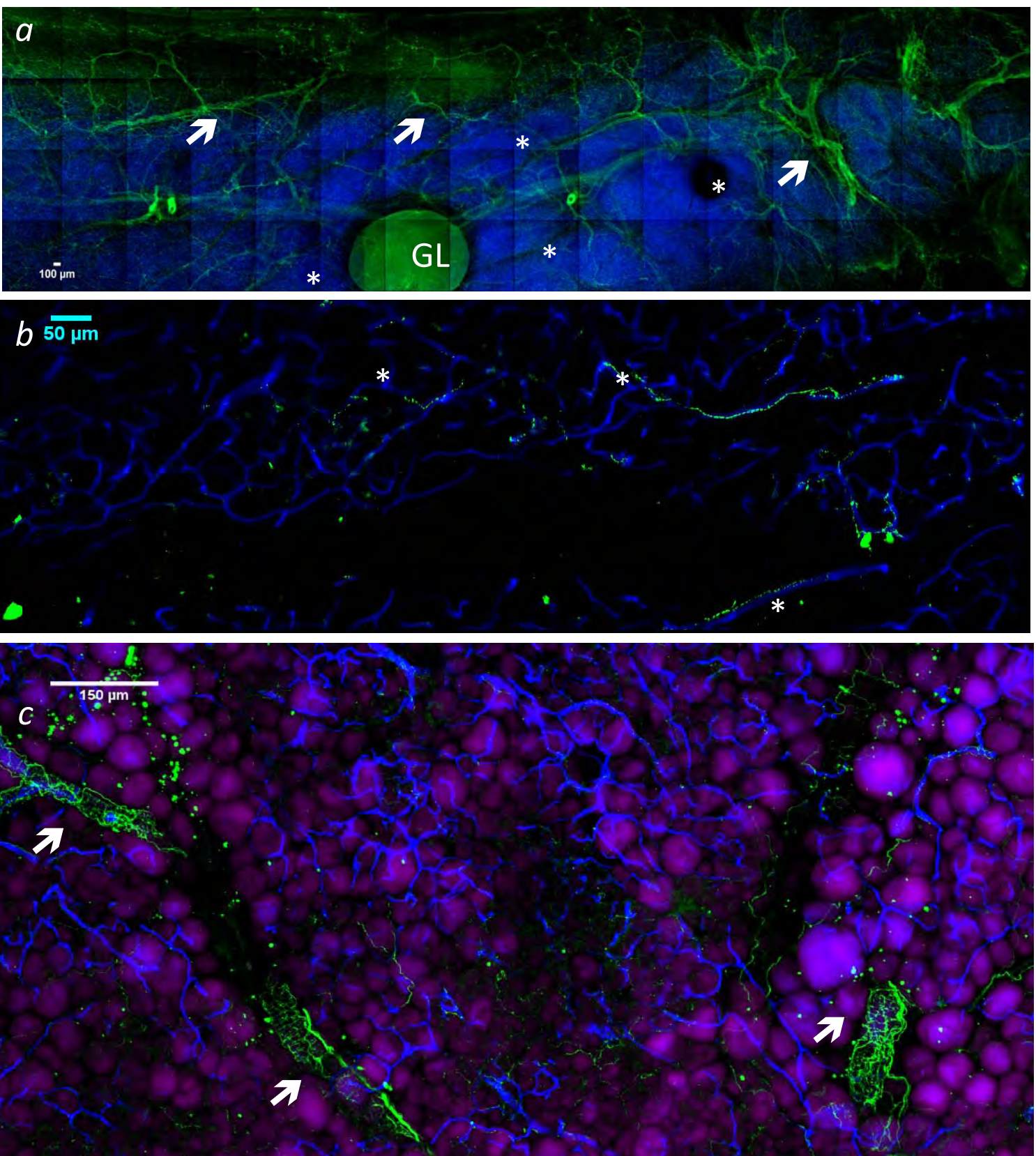
## ***Etude des relations « structure/fonction » du tissu adipeux sous-cutané inguinal***

### **I. Introduction**

Les organes sont en permanente communication les uns entre les autres *via* le système sanguin ou endocrinien. Plus un organe assure de fonctions, plus il va présenter une structure hétérogène avec des « régions » spécialisées. Le cœur, par exemple, présente une structure différente au niveau auriculaire et ventriculaire. Quant au foie, il contient différents types d'hépatocytes n'assurant pas tous la même fonction selon leur localisation. L'exemple le plus parlant est le système nerveux avec des réseaux neuronaux possédant des caractéristiques et fonctions différentes selon les régions cérébrales. Concernant le TA, même si ses fonctions ont largement été caractérisées, sa structure et la relation entre cette dernière et les différentes fonctions qu'il assure n'ont, elles, pas été étudiées à ce jour.

Cependant, l'ensemble de la communauté scientifique s'accorde à dire que ce tissu qui est doté d'une très grande plasticité, i) est constitué de plusieurs types cellulaires, ii) assure diverses fonctions (métabolique, endocrine, immune...) et iii) est organisé en dépôts qui ne sont pas identiques sur le plan fonctionnel (implication différente des dépôts profonds/sous-cutanés dans les maladies métaboliques, différences de ces dépôts dans la capacité à brunir...). D'un point de vue « structure », le TA est classiquement décrit comme organisé en lobules correspondant à des groupes d'adipocytes.

De la même manière, le foie est un tissu qui est aussi organisé en lobules <sup>352</sup>, hébergeant de nombreux types cellulaires (des hépatocytes, des progéniteurs, des cellules immunitaires...) et qui présente également une innervation et une vascularisation. Cette dernière est à l'origine de la « zonation hépatique » : selon



**Figure 40 : Organisation des fibres nerveuses autonomes sympathiques du TA**

- a) Vue globale de l'organisation des fibres nerveuses noradrénergiques (vert, TH) du TA. La vascularisation apparaît en bleu (marquage lectine). Les flèches montrent des groupes de fibres, généralement autour de vaisseaux sanguins, et en périphérie du tissu. Les étoiles montrent des endroits où les fibres sont isolées, dans le parenchyme. GL: ganglion lymphatique,
- b) Illustration de fibres isolées (étoiles) au centre du TA
- c) Illustration du maillage des gros vaisseaux sanguins par de multiples fibres TH (flèches)

leur localisation par rapport à cette vascularisation (artère hépatique, veine porte, veine centro-lobulaire), les hépatocytes n'assurent pas les mêmes fonctions<sup>353</sup>.

Au regard de ces données, nous émettons l'hypothèse que la structure du tissu adipeux est, comme celle du foie, hétérogène et que cette organisation structurale permet d'assurer les différentes fonctions de ce tissu. Afin de valider cette hypothèse, nous avons initié une caractérisation de la structure du TA en se focalisant sur le dépôt sous-cutané inguinal murin.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'organisation de l'innervation autonome sympathique de ce dépôt. Dans un second temps, nous avons développé des outils d'imagerie pour visualiser la totalité du dépôt afin de pouvoir aborder l'échelle des lobules de ce tissu. Les résultats obtenus nous ont amené à étudier cette structure 3D dans trois contextes : i) le « brunissement » de ce dépôt en réponse à la mise au froid des animaux (*article 1*), ii) la réponse à un régime hyper-lipidique et iii) l'effet de l'âge.

## **II. Résultats**

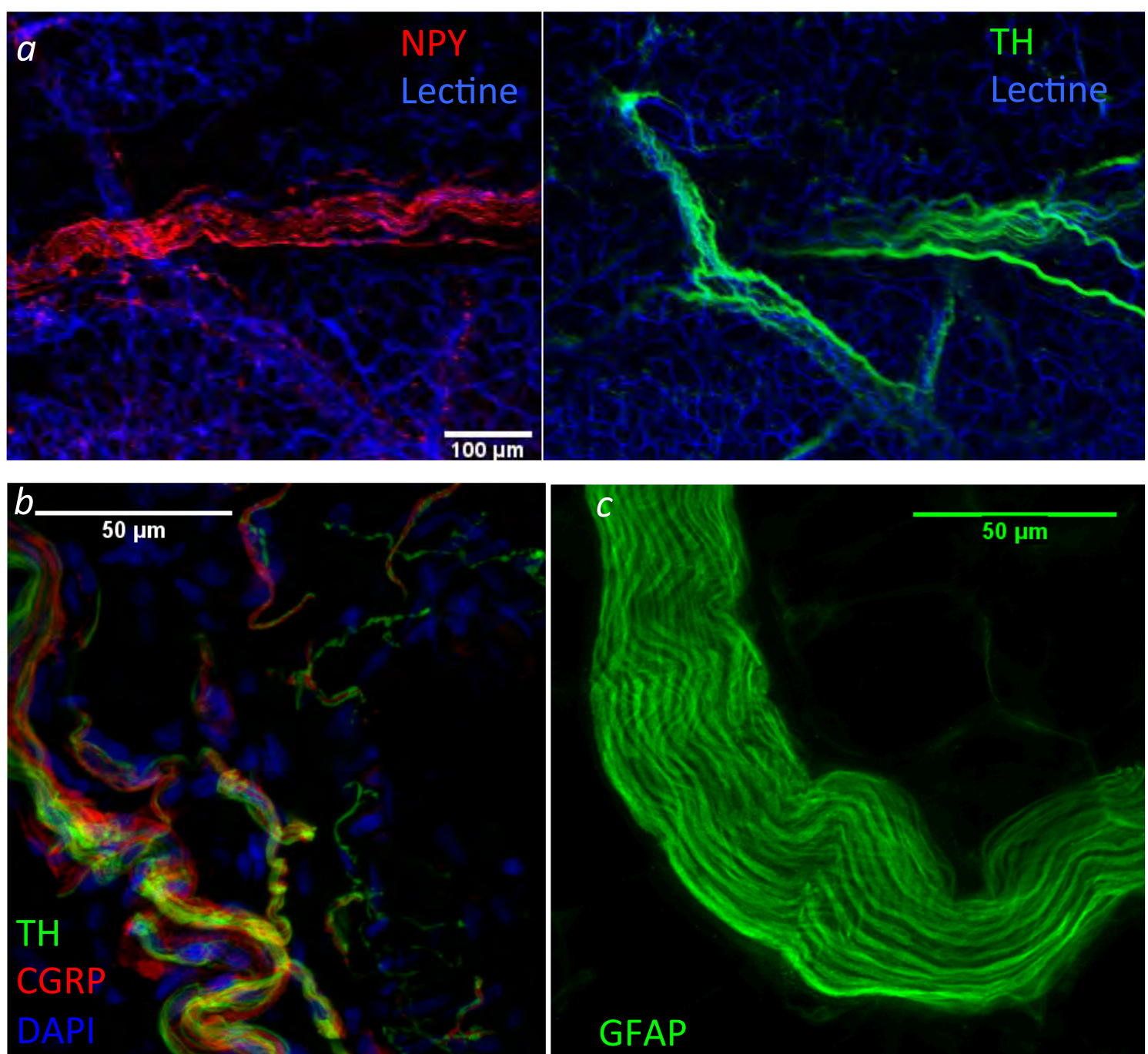
### **A. Organisation de l'innervation du tissu sous-cutané inguinal**

En arrivant au laboratoire, nous nous sommes demandés s'il existait des différences d'innervation (densité, nature) au sein du tissu sous-cutané. Comme mentionné dans l'introduction (*cf Chapitre 1, paragraphe III, B, 2, a*), cette innervation est double : il existe, en effet, une innervation efférente sympathique et une innervation afférente sensorielle.

L'innervation sympathique a été étudiée avec un anticorps anti-tyrosine hydroxylase (TH, enzyme limitante de la synthèse des catécholamines) alors que l'innervation sensorielle a été visualisée avec un anticorps anti-CGRP (neuropeptide présent dans les fibres sensorielles C). Nous avons également recherché la présence de cellules gliales qui entourent les fibres nerveuses : les cellules de Schwann, par marquage anti-GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein, élément du cytosquelette).

Par microscopie biphotonique à l'aide d'une acquisition dite « en mosaïque », l'imagerie de ce tissu a permis de mettre en évidence une innervation autonome sympathique organisée de manière hétérogène (*Fig. 40a*). En effet, une importante





**Figure 41 : Innervation du TA**

- a) Présence de fibres autonome sympathiques NPY (neuropeptide Y, rouge) et TH (vert) au sein du TA
- b) Innervation sensorielle par marquage du CGRP (rouge) et innervation autonome sympathique (TH, vert).
- c) Présence de cellules de Schwann révélées par un marquage GFAP (vert), 63x



densité de fibres (nerfs ?) est observée autour de gros vaisseaux préférentiellement en périphérie du TA (*Fig. 40b*). A côté de ce marquage, des fibres sympathiques isolées sont observées principalement au cœur du tissu (*Fig. 40c*). Le système nerveux sympathique autonome peut également libérer du neuropeptide Y. Nous nous sommes demandés si toutes les fibres autonomes sympathiques du TA étaient immuno-positives pour le NPY. Nos observations montrent que les paquets de fibres sont, dans leur grande majorité, à la fois immunopositives pour la TH et le NPY (*Fig. 41a*). Cependant, les fibres isolées dans le parenchyme, sont pour la plus part uniquement TH positives (données non montrées).

Nous avons également mis en évidence que le TA sous-cutané inguinal renfermait des fibres sensorielles immuno-positives pour le CGRP (Calcitonine Gene Related Peptide) (*Fig. 41b*) et des cellules de Schwann (*Fig. 41c*). De manière générale, nous avons observé que la densité de l'innervation sensorielle du TA est beaucoup moins importante que l'innervation autonome sympathique.

Par manque de temps et de disponibilité du microscope biphotonique, nous n'avons pas pu étudié la répartition exacte de l'innervation sensorielle et des cellules de Schwann.

*Ces premières données mettent en évidence que le TA est un tissu hétérogène quant à l'organisation de son innervation.*

## **B. Organisation tissulaire et fonction tissulaire au cours du brunissement** **(Article 1)**

Dans ce premier article, nous avons imagé le TA sous-cutané inguinal murin dans sa totalité, en associant une technique de transparisation et l'acquisition du signal d'autofluorescence par microscopie confocale. La reconstruction en trois dimensions de toutes les images acquises, puis leur traitement informatique à l'aide du logiciel Imaris, a permis de révéler une hétérogénéité structurale de ce tissu. A la suite, nous nous sommes demandés si cette hétérogénéité structurale était accompagnée d'une hétérogénéité fonctionnelle.



## Regionalization of Browning Revealed by Whole Subcutaneous Adipose Tissue Imaging

Corinne Barreau<sup>1†</sup>, Elodie Labit<sup>1†</sup>, Christophe Guissard<sup>1</sup>, Jacques Rouquette<sup>2</sup>, Marie-Laure Boizeau<sup>2</sup>, Souleymane Gani Koumassi<sup>2</sup>, Audrey Carrière<sup>1</sup>, Yannick Jeanson<sup>1</sup>, Sandra Berger-Müller<sup>1</sup>, Cécile Dromard<sup>1</sup>, Franck Plouraboué<sup>3</sup>, Louis Casteilla<sup>1\*</sup> and Anne Lorsignol<sup>1\*</sup>

**Objective:** White and brown adipose tissues play a major role in the regulation of metabolic functions. With the explosion of obesity and metabolic disorders, the interest in adipocyte biology is growing constantly. While several studies have demonstrated functional differences between adipose fat pads, especially in their involvement in metabolic diseases, there are no data available on possible heterogeneity within an adipose depot.

**Methods:** This study investigated the three-dimensional (3-D) organization of the inguinal fat pad in adult mice by combining adipose tissue clearing and autofluorescence signal acquisition by confocal microscopy. In addition, the study analyzed the expression of genes involved in adipocyte biology and browning at the mRNA and protein levels in distinct areas of the inguinal adipose tissue, in control conditions and after cold exposure.

**Results:** Semiautomated 3-D image analysis revealed an organization of the fat depot showing two regions: the core was structured into segmented lobules, whereas the periphery appeared unsegmented. Perilipin immunostaining showed that most of the adipocytes located in the core region had smaller lipid droplets, suggesting a brown-like phenotype. qPCR analysis showed a higher expression of the browning markers *Ucp1*, *Prdm16*, *Ppargc1a*, and *Cidea* in the core region than at the periphery. Finally, cold exposure induced upregulation of thermogenic gene expression associated with an increase of UCP1 protein, specifically in the core region of the inguinal fat depot.

**Conclusions:** Altogether, these data demonstrate a structural and functional heterogeneity of the inguinal fat pad, with an anatomically restricted browning process in the core area.

Obesity (2016) 00, 00–00. doi:10.1002/oby.21455

### Introduction

With the increase in the prevalence of obesity and metabolic disorders, the interest of scientists in white adipose tissue (WAT) is growing constantly. Since its principal function is to store and release lipids in response to energy-balance needs, understanding its biology appears crucial (1,2). WAT is located in distinct anatomical sites and exhibits a captivating plasticity at the tissue and/or cellular level. In addition to white adipocytes that contain a large unilocular vacuole, WAT also contains some multilocular adipocytes that are immunoreactive for the specific marker of brown adipocytes, uncoupling protein1 (UCP1) (3,4). This mitochondrial protein

uncouples the functioning of the respiratory chain from ATP synthase, thus generating heat. The number of UCP1-positive adipocytes within WAT increases strongly when animals are exposed to cold or under adrenergic stimulation, through the “browning process” (3-6). These adipocytes are different from the “classical” brown adipocytes located in brown adipose tissue (BAT) (such as the interscapular depot in mice) in terms of origin, activation, and metabolism and are named “brown-like adipocytes,” “beige,” or “brite” (brown in white) adipocytes. The demonstration that UCP1-positive adipocytes could be easily detected in adult humans has strongly renewed the interest in BAT and the browning process (7,8).

<sup>1</sup> Stromalab, Université de Toulouse, CNRS, EFS, INSERM, UPS, Toulouse, France. Correspondence: Louis Casteilla (louis.casteilla@inserm.fr) or Anne Lorsignol (anne.lorsignol@inserm.fr) <sup>2</sup> Institut des Techniques Avancées du Vivant, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France <sup>3</sup> Institut de Mécanique des Fluides, Université de Toulouse, INPT, UPS, Toulouse, France.

<sup>†</sup>Corinne Barreau and Elodie Labit contributed equally to this work.

**Funding agencies:** This work was supported by the EU FP7 project DIABAT (Health-F2-2011-278373), a grant from the CNRS (PEPS MATH), and a grant from the Midi-Pyrénées Region (DESR/12052900 and DESR/14050455).

**Disclosure:** The authors declared no conflict of interest.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

**Received:** 14 August 2015; **Accepted:** 12 December 2015; **Published online** 00 Month 2016. doi:10.1002/oby.21455

The molecular pathways driving brown and white adipocyte differentiation or adipocyte hyperplasia and hypertrophy have now been well investigated and described (2,9). While a large number of studies have demonstrated that adipose depots differ from each other in terms of “adipocyte biology” (10), there is no investigation on putative heterogeneity within a fat depot, although different histology studies clearly have suggested that the emergence of brite adipocytes is heterogeneous inside a given fat pad (4,11,12). Since Wassermann’s work in 1960 (13), very few data have become available on the global organization of adipose tissue. These investigations revealed that, in human embryo, WAT is made up of lobules corresponding to clusters of adipocytes, separated from each other by a structured extracellular matrix (ECM). In the liver, lobules make functional units essential to the functions of this organ (14). Depending on their location within a lobule, hepatocytes have different gene expression patterns inducing different metabolic functions, which is also known as “metabolic zonation” (15,16). Several studies have suggested that there is also heterogeneity among hepatic lobules (17,18). By analogy, the adipose tissue organization into lobules must be a fundamental element of adipose tissue homeostasis as it is present throughout adult life, in different species (19,20). Nevertheless, even though occasionally mentioned in the literature, the lobule level has not been fully investigated, leaving open several questions related to the organization, the functional heterogeneity, and the role of these adipose “units.”

To investigate a putative heterogeneity in browning ability, we investigated the global organization of the adipose depot using three-dimensional (3-D) imaging of the whole subcutaneous inguinal adipose tissue of adult C57BL/6 mice. In order to facilitate light penetration, the fat pad was cleared by replacing the water-based intra-/extracellular fluid with a solution of high refractive index to match that of the cell membrane (21). Moreover, microstructural details can be revealed, without any treatment of the specimen by antibodies or dyes, by acquisition of the nonspecific autofluorescence signal (22). Using these technologies and semiautomated 3-D image analysis, we demonstrated here, for the first time, that subcutaneous adipose tissue displays strong structural heterogeneity. This fat pad can be subdivided into two regions: in the core, software processing identified segmented lobules with clusters of small adipocytes whereas, at the periphery, a nonsegmented region with bigger adipocytes was observed. This structural heterogeneity is associated with functional heterogeneity: we show that brite adipocytes are preferentially located inside lobules and that the browning process after cold exposure does not affect the whole tissue but preferentially takes place in the lobules.

## Methods

### Animals

All experiments were carried out in compliance with European Community Guidelines (2010/63/UE) and approved by the French ethics committee. Experiments were performed on 6- to 8-week-old male C57BL/6J mice (Harlan Laboratories). The mice were group-housed (3 or 4 per cage) in a temperature-controlled room (21°C or 4°C depending on experiments) on a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. Cold exposure lasted 7 days.

### Inguinal adipose tissue preparation

Mice were killed by cervical dislocation and inguinal fat pads were removed. Depending on experiments, adipose tissues were fixed in

4% paraformaldehyde solution for 24 hours at 4°C (immunostaining) or directly stored in RNA Later (Qiagen) until use (RNA extraction). For whole tissue 3-D imaging, fixed tissue was embedded in 1% agarose before being dehydrated by graded series of ethanol incubations and then cleared by incubation in benzyl alcohol-benzyl benzoate solution (BABB, 1:2 vol:vol ratio) (Sigma Aldrich). BABB treatment is used to facilitate visible light penetration through the specimens by replacing the water-based intra-/extracellular fluids with a solution of high refractive index to match that of the cell membrane. BABB thus induces light scattering between the cell membrane and the surrounding media thereby rendering the tissue specimens transparent to visible light (23). For 2-D imaging and immunohistochemistry, the fixed inguinal fat pads were cut into 300  $\mu$ m serial horizontal sections with a vibratome (Campden).

*In vivo*, the inguinal adipose tissue is inserted into the back of the animal by its apex and the ventral insertion is located toward the groin (Figure 1A). For further studies, the inguinal adipose tissue was systematically oriented as shown in Figure 1B: the *X* axis was defined by the length of tissue with the apex at the left and the groin at the right. The *Y* orientation corresponded to the width of the tissue according to the animal’s antero-posterior axis. The *Z* orientation corresponded to the thickness of the tissue defined by the “skin-to-muscle” axis.

### Epifluorescence macroscopy: 2-D imaging of adipose tissue sections

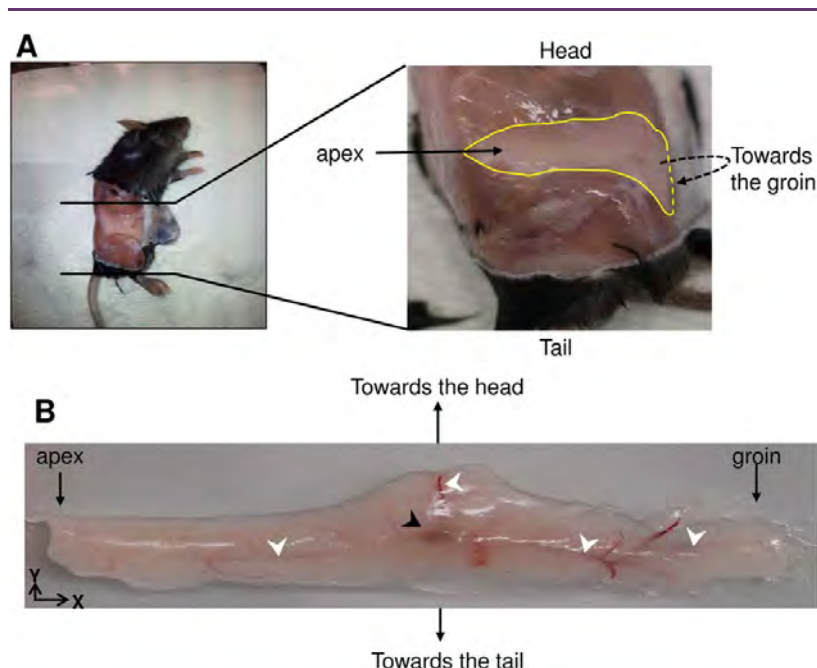
Sections of 300  $\mu$ m thickness were analyzed using autofluorescence signal without any previous staining. Image acquisition was performed using a MacroFluo Z16 APO macroscope (Leica). The objective used for observation and acquisition was a Planapo 2.0X WD 39 mm with a physical zoom (1.6). Samples were excited with a metal halide bulb (HXP, Osram) and a fluorescence excitation filter (HQ470/40). The emitted light was acquired through a band-pass filter HQ525/50 (Chroma Technology Corp.) by a CoolSNAP ES2 CCD camera (Roper) driven by the MetaVue software (Universal Imaging). Images were processed using Fiji software (NIH).

2-D image analysis was performed manually by identifying and drawing septa between adipocyte clusters. A lobule was defined as a surface closed by continuous septa. Quantification was carried out on the horizontal and median section of the inguinal fat pad. This analysis was done twice by the same person in a blinded way. The mean area occupied by identifiable lobules, after two blinded analysis on a representative sample, was  $26.34 \pm 0.62 \text{ mm}^2$ .

### Confocal microscopy: 3-D imaging of whole cleared fat pad

The autofluorescence signal of the whole cleared inguinal fat pad was acquired using a Confocal Laser Scanning microscope (LSM510 NLO, Carl Zeiss) with an EC-Plan-Neofluar 10X/0.3 objective, after excitation using a 488 nm argon laser. The whole tissue autofluorescence signal was collected with a 500–530 nm bandpass filter. Multiple positions were acquired with an overlap of 10% and a *z*-stack was performed. Final images were obtained by stitching all the acquired positions using image metadata Grid/collection stitching plugins of Fiji software (24).

The whole fat pad was characterized into segmentable (SLA) and nonsegmentable lobule areas (NSLA) and the lymph node and main vessels were removed from the picture using a semiautomated



**Figure 1** Anatomy of the right inguinal adipose tissue. (A) *In situ* orientation of the fat pad when the mouse is lying on its left side. (B) *Ex vivo* orientation for manipulation and imaging. The right adipose tissue is laid down on the muscle surface. The lymph node (black arrowhead) and main vascularization (white arrowheads) are visible by transparency.

method with the “surpass” module of Imaris software (Bitplane). The different volumes were extracted using the Imaris statistics module (Bitplane). A flow chart (Supporting Information, Figure S1) illustrating the successive steps of image analysis is given in the Supporting Information.

### Immunohistochemistry

Adipose tissue sections of 300  $\mu\text{m}$  thickness were incubated in blocking solution (2% Normal Horse Serum and 0.2% triton X-100 in PBS) at room temperature (RT) and incubated for 24 h at RT with primary antibody against perilipin (1:250, Sigma Aldrich) or UCP1 (1:5000, kindly provided by D. Ricquier). Sections were incubated overnight at 4°C with an Alexa 488-conjugated secondary antibody (Life Technology). Nuclei were stained with DAPI (Sigma Aldrich) and sections were mounted on a coverslip. Imaging was performed using a confocal Laser Scanning microscope (LSM510 NLO, Carl Zeiss). Morphometric analysis of lipid droplets was performed using Fiji software (NIH) on the horizontal and median section of the inguinal fat pad.

### RNA extraction and quantitative real-time RT-PCR

Inguinal fat pads were placed on ice-cooled microscope slides and small blocks of SLA and NSLA were dissected using a scalpel and sharp forceps under a binocular loupe. Total RNA was isolated from SLA and NSLA samples of inguinal fat pad using Qiagen RNeasy kit (Qiagen) and purified using RNeasy microcolumns. RNA integrity and quantity were

checked with Experion RNA StdSens Analysis Kit (Bio-Rad). Seven hundred and fifty nanograms of total RNA were reverse-transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies/Applied Biosystem), SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies/Applied Biosystem), and 0.2  $\mu\text{M}$  primers, on a Viia7<sup>TM</sup> (Applied Biosystem) instrument. Relative gene expression was determined using the  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  method and normalized to *36B4* level. Primers are listed in Table 1. All mRNA expression analysis was performed blind.

### Statistical analysis

All data are expressed as means  $\pm$  SEM. An unpaired *t* test was used to calculate final *P* values using GraphPad Prism software. Differences among groups were considered significant at *P* < 0.05.

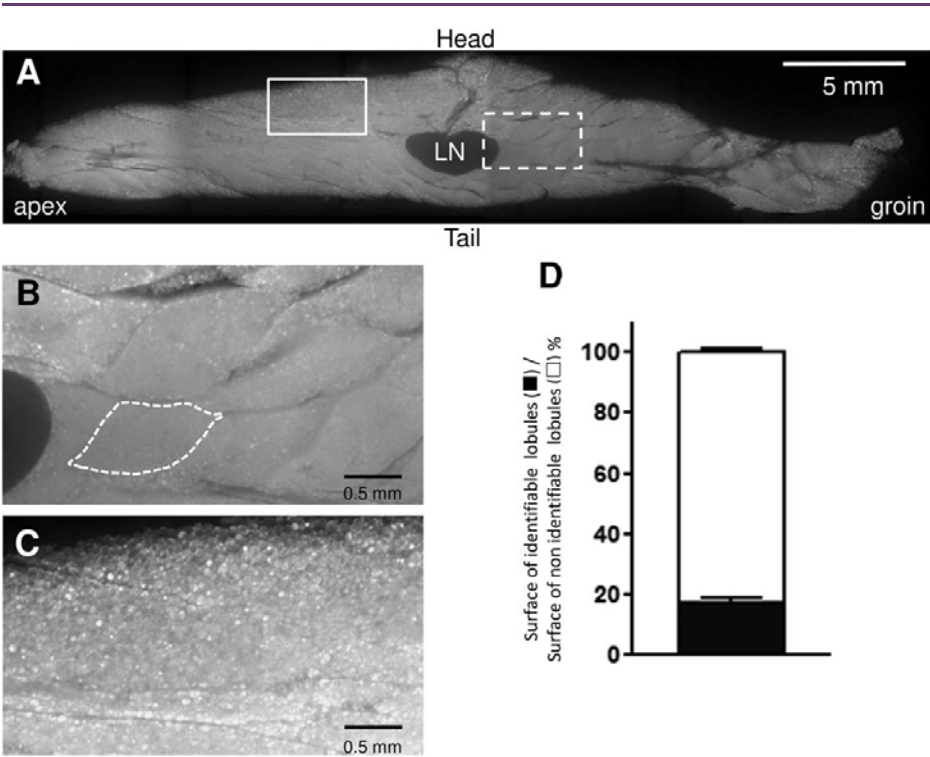
## Results

### 2-D imaging of inguinal fat pad reveals tissue heterogeneity

A general and representative view of the largest horizontal section of the fat pad is shown in Figure 2A. It corresponds to the section where the lymph node (LN) was the largest. Two regions could be distinguished in the adipose parenchyma: one in the core of the tissue where lobules were easily distinguished (Figure 2B) and a more diffuse region at the periphery where, although some septa were visible, closed, contiguous lobules could not be defined (Figure 2C).

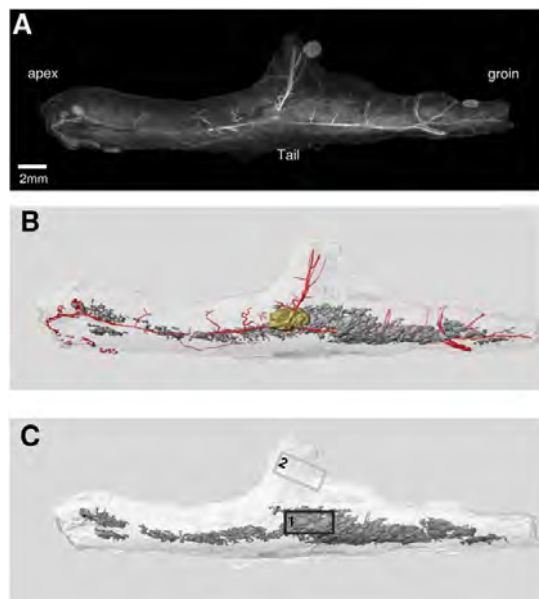
TABLE 1 List and sequence of primers

	Forward primer	Reverse primer
Ppar $\gamma$	AGTGTGAATTACAGCAATCTCTGTTT	GCACCATGCTCTGGTCAA
Ppar $\alpha$	GCAAGGCCTCAGGGGTAGCA	GCCGAATAGTTGCGG
36b4	AGTCGGAGGAATCAGATGAGGAT	GGCTGACTTGGTTGCTTTGG
Ap2	GATGCTTTGTGGGAACCTG	GCCATGCCTGCCACTTTC
Leptin	AAGACGATTGTCACCAGGATCAA	ACCCCTCTGCTTGGCGGATA
Ucp1	AAGCTTGCTGTCACCTCTCTAC	TCTAGAGTCTGAGGAAAGGG
Ppargc1a	TGATGACAGTGAAGATCAAAGTGATAAAC	GGCGACACATCGAACATGAACAATGA
Cidea	CTAGCACCAAGGCTGGTC	CACGCAGTTCACACACTC
Sdha	GTCCATACACCGAATAAGAGC	GTCCCTGTGCTGGTATG
Cox7a1	CAGCGTCAGTCTGT	AGAAAACCGTGTGGCAGAGA
Cox8b	GAACCATGAAGCCAACGACT	GCGAAGTTCACAGTGGTTCC
Prdm16	GCACTTGCTTAAATACATATGACGTGTT	CAGCTGGAGGCCTTTCT
Mct1	GAGGTTCTCCAGTGCTGT	TCCATACATGTCATTGAGGCG
Mct4	AGTGCCATTGGTCTCGTG	CATACTTGTAACTTTGGTTGC



**Figure 2** 2-D imaging reveals structural heterogeneity of inguinal adipose tissue. (A) Image obtained with a microscope from a whole horizontal and median 300 μm section. Note the lymph node (LN) in the center of the fat pad section. (B) Magnification of the dotted square of panel A. In this part of the tissue, lobules are easily identifiable. An example of a delimited lobule is shown by the dotted line. (C) Magnification of the white square of panel A. In this part of the tissue, lobules are not easily identifiable. (D) Quantification of the areas where lobules are identifiable and nonidentifiable ( $n = 5$  animals).





**Figure 3** 3-D confocal imaging of whole cleared inguinal adipose tissue confirms structural heterogeneity. (A) Image corresponding to the 3-D-visualization of inguinal fat depot after stitching process and before any image treatment. (B) Volume-rendering pseudoimage obtained after Imaris segmentation, illustrating lymph node (yellow) and main vascularization (red) of adipose tissue. These volumes were removed for further lobule segmentations. (C) Final pseudoimage showing two regions within inguinal fat pad: a central area with SLA (dark gray) and a surrounding area with NSLA (light gray). Rectangles 1 and 2 show regions in SLA and NSLA, respectively, in which further RT-PCR and immunostaining studies were performed (Figures 4 and 5).

Magnification of the images allowed each lobule to be manually delineated (Figure 2B, white-dotted line) and its surface area quantified. Fiji quantification revealed that the area occupied by identifiable lobules made up less than 20% of the surface of the median section (Figure 2D,  $n = 5$  animals).

### 3-D imaging of whole cleared fat pad confirms a structural heterogeneity

To confirm the tissue heterogeneity revealed by the 2-D analysis, we performed 3-D imaging and semiautomated analysis of the whole cleared inguinal fat pad.

One 3-D-visualization of an inguinal fat depot after the stitching process and before any image treatment is shown in Figure 3A. Autofluorescence revealed anatomical details such as a high density of cells separated by ECM accumulation, lymph node, or main vascularization (Figure 3A and Supporting Information video). For further image analysis and to identify lobules as adipocyte clusters separated by ECM septa, the main blood vessels and lymph node (in red and yellow in Figure 3B) were removed from all z-images by Imaris software.

The semiautomated 3-D segmentation confirmed the tissue heterogeneity observed with 2-D images. The inguinal fat pad core was

organized in segmentable lobules (Figure 3C, dark gray area), whereas the periphery was not structured in individualized lobules (Figure 3C, light gray area). These two regions are referred to as the “segmentable lobule area” (SLA) and the “nonsegmentable lobule area” (NSLA) in the following sections. The quantification of the SLA volume revealed that this part composed less than 10% of the total volume of the fat pad (SLA:  $7.27 \pm 2.8 \text{ mm}^3$  vs. NSLA:  $75.73 \pm 25.6 \text{ mm}^3$ ,  $n = 3$  animals).

### Brite adipocytes are preferentially localized within SLA

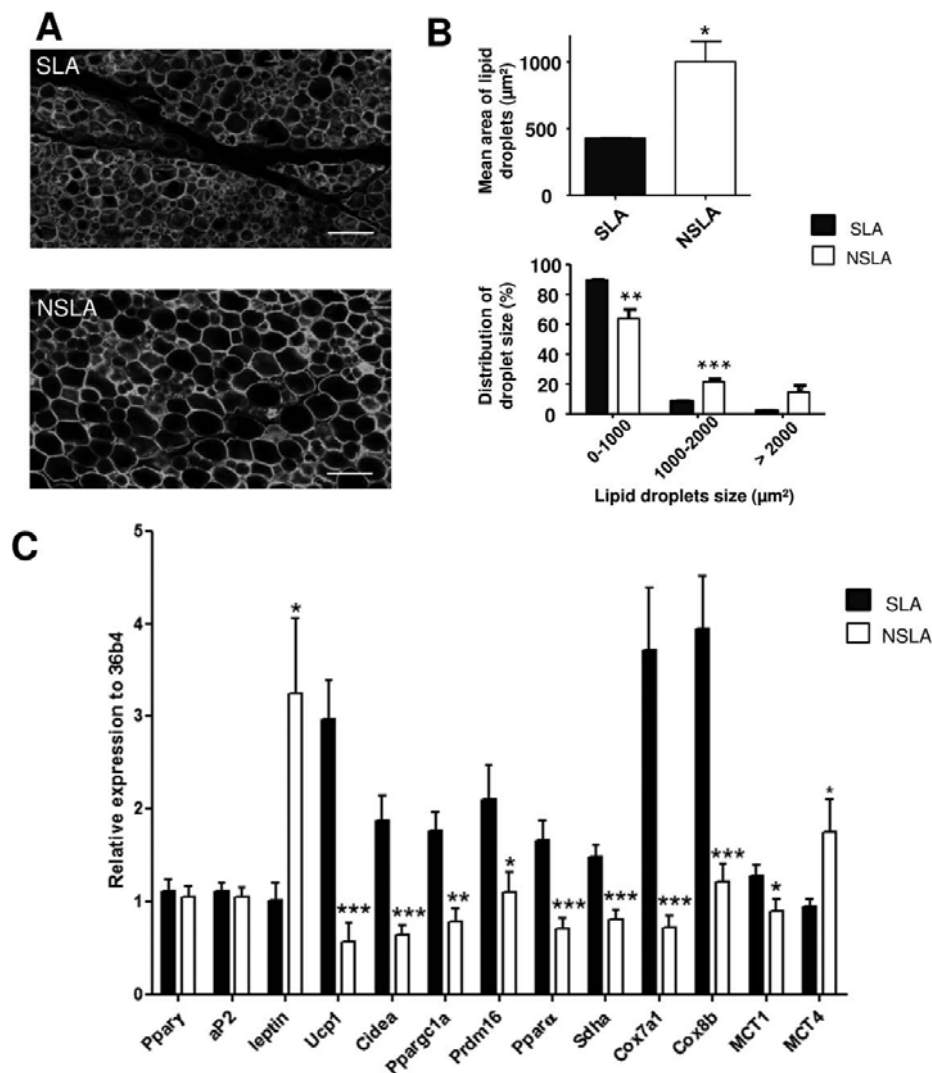
We next aimed to determine whether the above structural heterogeneity was associated with a functional heterogeneity. We investigated the morphology of mature adipocytes in both SLA and NSLA regions. Immunostaining of Perilipin, a specific protein surrounding the lipid droplets, revealed a smaller size of lipid droplets in the SLA than in the NSLA regions (Figure 4A and 4B Top) ( $400 \pm 5.6 \mu\text{m}^2$  compared to  $1000 \pm 310 \mu\text{m}^2$  for SLA and NSLA, respectively,  $P < 0.05$ ,  $n = 5$  animals). Similar results were obtained when the distribution of lipid droplet sizes was investigated in the two regions: in SLA, adipocytes contained more small droplets (below  $1000 \mu\text{m}^2$ ) and fewer big droplets ( $>1000 \mu\text{m}^2$ ) than the NSLA adipocytes (Figure 4B bottom).

This difference in lipid droplet size between SLA and NSLA led us to investigate whether adipocytes localized within these two different regions displayed the same biological features. Comparative analysis of gene expression of microdissected pieces of SLA and NSLA regions revealed different mRNA levels for genes corresponding to the brown oxidative adipocyte profile. *Ucp1* expression was dramatically increased in SLA compared to NSLA regions. This increase was associated with a higher expression of additional key thermogenic genes as well as mitochondrial markers (Figure 4C,  $n = 15$  animals). Interestingly, the expression of monocarboxylate transporters *Mct1* and *Mct4*, which we have recently demonstrated to be involved in the browning process (26), was also significantly higher and lower in SLA compared to NSLA respectively. While no difference was detected in the content of mRNA coding for *Ppar $\gamma$* , *aP2*, a lower expression of *Leptin* was observed in SLA (Figure 4C,  $n = 15$  animals).

### Cold exposure induces the apparition of brite adipocytes in the SLA region only

It is well known that chronic cold exposure largely increases the number of brite adipocytes in the subcutaneous white fat pad. We thus investigated the partitioning between SLA and NSLA and the expression of “browning” genes in the two regions after mice had been exposed to  $4^\circ\text{C}$  for 7 days.

Quantification of SLA and NSLA volumes using 3-D images of cleared inguinal fat pads revealed no statistical difference between control ( $21^\circ\text{C}$ ) and cold-exposed mice (Figure 5A,  $n = 3$  animals). Strikingly, while no change was observed in NSLA after cold exposure (Figure 5B right panel,  $n = 6$  animals), the data revealed an overexpression of *Ppar $\alpha$* , *Pparg1a*, *Ucp1*, and *Mct1* genes in SLA (Figure 5B left panel,  $n = 6$  animals) suggesting that the browning process occurred in SLA only. To confirm these data, immunostaining was performed to detect the protein UCP1. Consistently with quantitative real-time PCR (RT-qPCR) results, UCP1 immunostaining was increased only in the SLA of cold-exposed mice and this



**Figure 4** Cellular and molecular heterogeneity of inguinal fat pad. (A) Heterogeneity of lipid droplet sizes depending on the location within the tissue. Perilipin immunostaining in the SLA (top) and NSLA (bottom) (scale bar: 100  $\mu\text{m}$ ). (B, top panel) Quantification of mean size of lipid droplets depending on their location within the inguinal adipose tissue. (B, bottom panel) Distribution of lipid droplet sizes in SLA and NSLA (black and white bars, respectively) ( $n = 5$  animals). (C) Heterogeneity of gene expression depending on the location within the tissue estimated by RT-qPCR in SLA and NSLA respectively ( $n = 15$  animals). Values expressed as means  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  SLA, vs. NSLA.

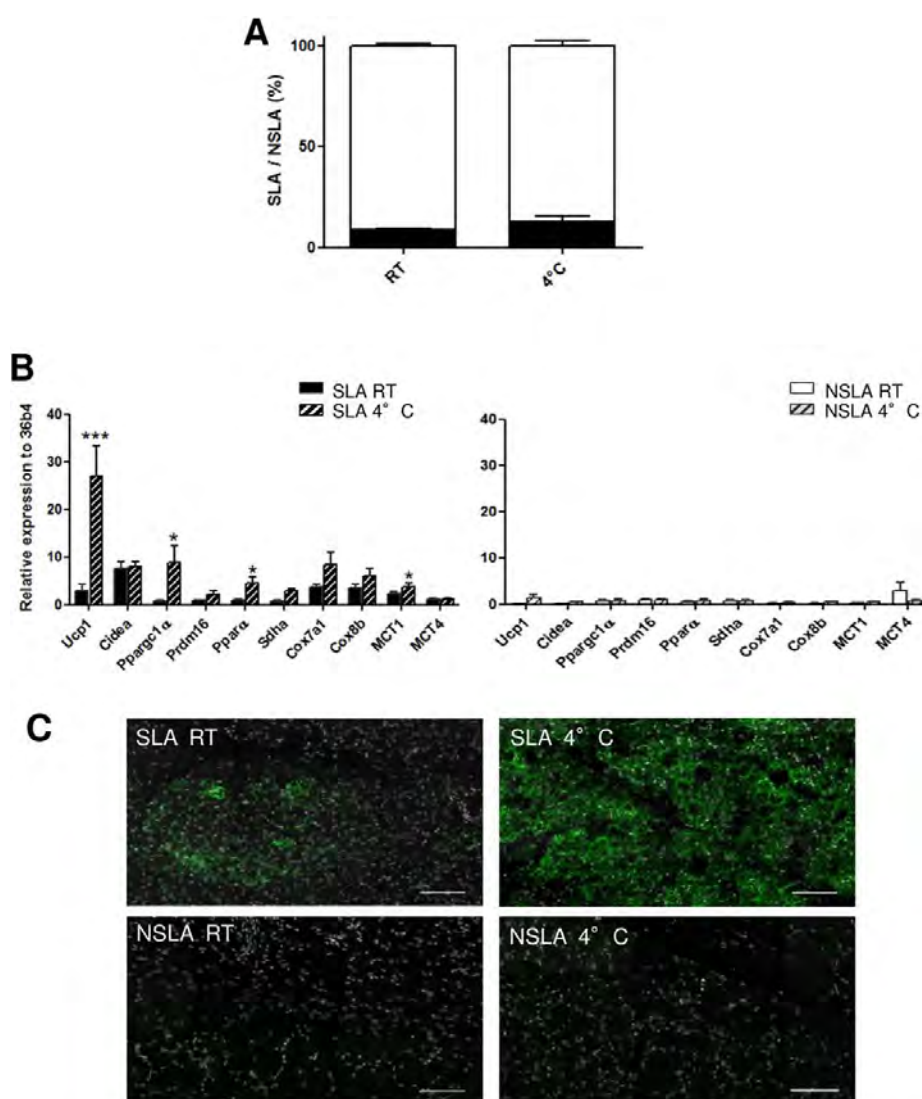
upregulation was mainly due to an increase in UCP1-positive cells (Figure 5C).

Altogether these data demonstrate that the structural heterogeneity revealed by our 3-D images of the whole inguinal fat pad reflects a cellular and molecular heterogeneity and that brite adipocytes were not scattered randomly through the whole adipose tissue but were preferentially located in SLA.

## Discussion

While most studies demonstrate that subcutaneous and visceral fat depots are functionally different, without taking possible heterogeneity inside a fat depot into account, our study clearly shows that (i) inguinal adipose tissue is spatially organized and (ii) its structural regionalization is associated with a compartmentalization of browning ability.





**Figure 5** Cold-induced browning ability depends on the location in the tissue. **(A)** Quantification of the volume occupied by SLA and NSLA in mouse inguinal adipose tissue maintained at room temperature (RT) or at 4°C for 7 days. Analysis was carried out on 3-D images as described in Figure 3 ( $n=3$  animals). **(B)** The expression of genes involved in browning was estimated by RT-qPCR in SLA and NSLA of inguinal adipose tissue of mice exposed at RT or 4°C for 7 days ( $n=6$  animals). Values expressed as means  $\pm$  SEM. \* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$ , SLA vs. NSLA. **(C)** Immunostaining of UCP1 protein in both areas of inguinal adipose tissue of mice maintained at RT or 4°C for 7 days. Nuclei were stained with DAPI (gray). Scale bar 100  $\mu$ m.

An investigation of the organs anatomy is important for the understanding of physiological and pathological states. Under current conventional microscopy techniques, tissues and organs need to be sectioned but 3-D reconstructions of large samples are very laborious and difficult to obtain (22,23). The use of microscopy imaging applied to the entire mount is a reliable technical solution to such

issues. Unfortunately, the scattering of imaging light due to the different refractive indices of the various structures limits optical imaging of thick tissues. Optical clearing of tissue by organic solvents, which make the biological tissue transparent by matching the refractory indexes of different tissue layers to those of the solvent, is becoming a prominent method for imaging thick tissue as it

overcomes these limitations (26). Adipose tissue has most often been sectioned to a thickness of less than 20–30  $\mu\text{m}$  (27,28), which is smaller than the adipocyte diameter. Such investigations have made it difficult to draw relevant conclusions about the global organization of this tissue. This study reports the first use of optical clearing and confocal microscopy to investigate the global organization of the inguinal adipose depot. This strategy allowed us to image the whole inguinal adipose depot of adult mice.

In order to image microstructures at cell-size resolution, different cell populations are usually immunostained. However, the penetration of antibodies or dyes inside a thick tissue is always limited. To avoid this technical problem, imaging the signals emitted by endogenous fluorophores is an alternative to standard histological preparations for rapid examination of fresh biopsies and has been developed mainly in pathological diagnosis (22,29,30). As observed in other tissues (26,31), the intrinsic fluorescence of the inguinal adipose depot clearly showed microanatomical details such as lymph node, main vascularization, and septa between adipocyte clusters (Figure 3A and supplementary video). Intrinsic fluorescence is a composite signal that is difficult to analyze finely and that includes various putative molecules, located within different cell compartments (NADPH, lipo-pigments, flavin coenzymes, and so forth) (32,33). Although we have not pinpointed the exact source of tissue auto-fluorescence, this opens up new ways of imaging adipose tissue in 3-D in the future, including in humans.

We used a semiautomated computational approach to delineate 3-D volumetric adipose lobules, which were then turned into 3-D surface-rendered data. This approach enabled several samples to be compared. Although this approach is not completely automated and thus depends on the experimenter during image analysis, it is important to note that similar percentages of segmented and nonsegmented lobule areas were obtained with 2-D and 3-D images.

Whatever the imaging processes, the structural analysis clearly revealed two distinct regions: a core region with well identified segmented lobules and a peripheral region where segmentation was not possible (SLA and NSLA respectively). The most structured region, that is, SLA, only formed about 10%–20% of the whole tissue in our experimental conditions. This conclusion may be surprising as, in Wasserman's study, human embryonic and postembryonic adipose tissue is considered as entirely composed of lobules (13). This discrepancy between the earlier study and our result may reflect species and developmental differences. Moreover, other studies that described the presence of lobules in adipose tissue investigated neither their distribution nor their proportion within the whole fat pad (19,34). Preliminary investigations on other adipose depots in the mouse (including epididymal, mesenteric, and interscapular fat pads) suggest that a similar structural heterogeneity could be observed in some pads (data not shown). These results raise the question of the role and developmental origin of the two parts.

Our analysis reveals that lipid droplets were larger in the periphery than in the core region of the depot. This is consistent with higher expression of leptin in the NSLA region. In contrast, the smaller lipid droplets observed in the SLA were associated with the presence of UCP1-immunopositive adipocytes and a high expression level of browning genes. This presence of a significant number of brite adipocytes was not surprising since experiments were performed on animals maintained at 21°C, which is below the tempera-

ture of thermoneutrality in mice. This could be linked with a weak sympathetic nervous system activation that would explain the presence of such brite adipocytes.

After 7 days at 4°C, the ratio between SLA and NSLA volume had not changed. Consistently with previous reports (4,12), the number of UCP1-immunopositive adipocytes increased, but only in the SLA part. Further studies to investigate WAT browning process and brite adipocyte biology must consider this tissue compartmentalization when taking tissue samples. The relatively small volume dedicated to browning (10%–20% of the inguinal fat pad volume) raises questions about the physiological consequences of this tissue. It is noteworthy that brown adipocytes are highly thermogenic cells. After cold exposure, the activation of only 150–200 g of BAT in an adult human significantly contributes to the 80% increase in total energy expenditure (35). Our result definitively demonstrates not only that the structural heterogeneity of adipose tissue is associated with functional differences but also that the browning process is spatially restricted to a central part of the pad where lobules can be individualized. This opens up the question of the physiological relevance of this association. It is noteworthy that lobules are located near the main vasculature of the tissue. The colocation of brite adipocytes and lobules would be consistent with the specific link between brown adipocytes and vascularization required to import oxygen and nutrients and to export heat (36,37). Since the sympathetic nervous system is intimately involved in the browning process (4), it is also reasonable to speculate that the SLA is highly innervated, although no data concerning the fine organization of sympathetic innervation within the inguinal fat pad is available.

Taken together, our results, which demonstrate the specific location of browning associated with a structural heterogeneity of the inguinal adipose tissue, revive the debate on tissue organization, the developmental origins of the adipocyte lineage, and the plasticity between WAT and BAT. It emphasizes the fact that the anatomical and structural organization of adipose tissue needs to be revisited in all species and particularly in humans. **O**

## Acknowledgments

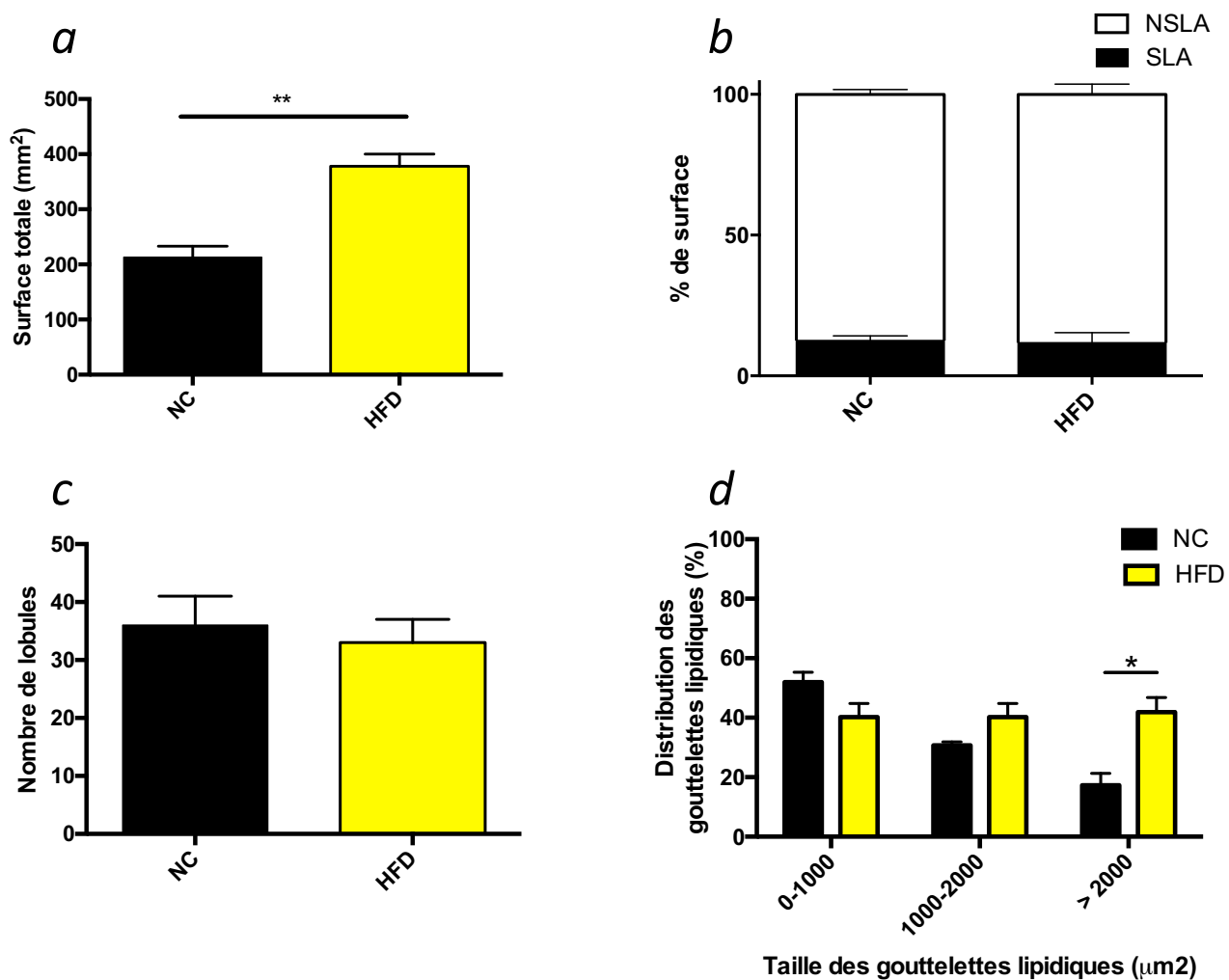
The authors are grateful to the Institut des Techniques Avancées du Vivant (ITAV, USR3505) and to the I2MC/UMR1048, Genome and Transcriptome Platform of Toulouse "Génopole."

© 2016 The Obesity Society

## References

1. Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Thematic review series: Adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res* 2007;48:1253–1262.
2. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell* 2014;156:20–44.
3. Loncar D. Convertible adipose tissue in mice. *Cell Tissue Res* 1991;266:149–161.
4. Cousin B, Cinti S, Morroni M, et al. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: Molecular and morphological characterization. *J Cell Sci* 1992;103:931–942.
5. Klingenspor M. Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. *Exp Physiol* 2003;88:141–148.
6. Young P, Arch JR, Ashwell M. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett* 1984;167:10–14.
7. Cereijo R, Giral M, Villarroya F. Thermogenic brown and beige/brite adipogenesis in humans. *Ann Med* 2015;47:167–177.

8. Cannon B, Nedergaard J. Metabolic consequences of the presence or absence of the thermogenic capacity of brown adipose tissue in mice (and probably in humans). *Int J Obes* 2010;34:S7-16.
9. Peirce V, Carobbio S, Vidal-Puig A. The different shades of fat. *Nature* 2014;510:76-83.
10. Tchakonia T, Thomou T, Zhu Y, et al. Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metab* 2013;17:644-656.
11. Vitali A, Murano I, Zingaretti MC, Frontini A, Ricquier D, Cinti S. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J Lipid Res* 2012;53:619-629.
12. Barbatelli G, Murano I, Madsen L, et al. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298:53.
13. Wassermann F. The development of adipose tissue. *Compr Physiol*. 2011, Supplement 15: *Handbook of Physiology* 1965, pp. 87-100. doi:10.1002/cphy.cp05011
14. Gebhardt R, Matz-Soja M. Liver zonation: Novel aspects of its regulation and its impact on homeostasis. *World J Gastroenterol* 2014;20:8491-8504.
15. Jungermann K, Kietzmann T. Oxygen: Modulator of metabolic zonation and disease of the liver. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2000;31:255-260.
16. Jungermann K, Kietzmann T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Ann Rev Nutr* 1996;16:179-203.
17. Ishikawa T, Mori M, Ichikawa Y, Kitoh J, Yamashita K. Three-dimensional observations of spatial arrangement of hepatic zonation and vein system in mice and house musk shrews. *Anat Rec* 2000;260:228-237.
18. Teutsch HF. The modular microarchitecture of human liver. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2005;42:317-325.
19. Hausman GJ, Kauffman RG. The histology of developing porcine adipose tissue. *J Anim Sci* 1986;63:642-658.
20. Macchi V, Tiengo C, Porzionato A, et al. Histotopographic study of the fibroadipose connective cheek system. *Cells Tissues Organs* 2010;191:47-56.
21. Ertürk A, Becker K, Jährling N, et al. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc* 2012;7:1983-1995.
22. Mori H, Borowsky AD, Bhat R, Ghajar CM, Seiki M, Bissell MJ. Laser scanning-based tissue autofluorescence/fluorescence imaging (LS-TAFI), a new technique for analysis of microanatomy in whole-mount tissues. *Am J Pathol* 2012;180:2249-2256.
23. Becker K, Jährling N, Saghati S, Weiler R, Dodt H-U. Chemical clearing and dehydration of GFP expressing mouse brains. *PLoS One* 2012;7.
24. Preibisch S, Saalfeld S, Tomancak P. Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics* 2009;25:1463-1465.
25. Carriere A, Jeanson Y, Berger-Muller S, et al. Browning of white adipose cells by intermediate metabolites: An adaptive mechanism to alleviate redox pressure. *Diabetes* 2014;63:3253-3265.
26. Dodt HU, Leischner U, Schierloh A, et al. Ultramicroscopy: Three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat Methods* 2007;4:331-336.
27. Berry R, Church CD, Gericke MT, Jeffery E, Colman L, Rodeheffer MS. Imaging of adipose tissue. *Meth Enzymol* 2014;537:47-73.
28. Cinti S, Zingaretti MC, Cencello R, Ceresi E, Ferrara P. Morphologic techniques for the study of brown adipose tissue and white adipose tissue. *Methods Mol Biol* 2001;155:21-51.
29. Monici M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Ann Rev* 2005;11:227-256.
30. DaCosta RS, Andersson H, Cirocco M, Marcon NE, Wilson BC. Autofluorescence characterisation of isolated whole crypts and primary cultured human epithelial cells from normal, hyperplastic, and adenomatous colonic mucosa. *J Clin Pathol* 2005;58:766-774.
31. Brede C, Friedrich M, Jordan-Garrote AL, et al. Mapping immune processes in intact tissues at cellular resolution. *J Clin Invest* 2012;122:4439-4446.
32. Zipfel WR, Williams RM, Christie R, Nikitin AY, Hyman BT, Webb WW. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:7075-7080.
33. Richards-Kortum R, Sevick-Muraca E. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Ann Rev Phys Chem* 1996;47:555-606.
34. De Caro R, Aragona F, Herms A, Guidolin D, Brizzi E, Pagano F. Morphometric analysis of the fibroadipose tissue of the female pelvis. *J Urol* 1998;160:707-713.
35. Ouellet V, Labbé SMM, Blondin DP, et al. Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J Clin Invest* 2012;122:545-552.
36. Xue Y, Petrovic N, Cao R, et al. Hypoxia-independent angiogenesis in adipose tissues during cold acclimation. *Cell Metab* 2009;9:99-109.
37. Cao Y. Angiogenesis and vascular functions in modulation of obesity, adipose metabolism, and insulin sensitivity. *Cell Metab* 2013;18:478-489.



**Figure 42 : Effet du régime gras sur l'organisation du TA inguinal**

a) Le régime gras (HFD) augmente la surface totale du TA mais b) ne modifie pas l'organisation du TA (répartition SLA/ NSLA), ni c) le nombre de lobules. d) Le nombre d'adipocytes avec des gouttelettes lipidiques ayant une surface supérieure à 2000 µm<sup>2</sup> augmente en périphérie avec le régime HFD, n=5.

Test statistique : t-test : \*p<0,05, \*\* p<0,01

L'ensemble des résultats présentés dans cet article met en évidence que :

- Le TA inguinal est composé de deux régions : une région organisée en lobules (la SLA) au cœur du dépôt et une région non-organisée en lobules (la NSLA) située en périphérie.
- La mise au froid des souris entraîne le « brunissement » de la SLA uniquement.

Pour étoffer notre étude, nous avons évalué si ces deux régions répondaient de manière différente à d'autres « stress » tels que la mise sous régime hyper-lipidique des souris ou le vieillissement.

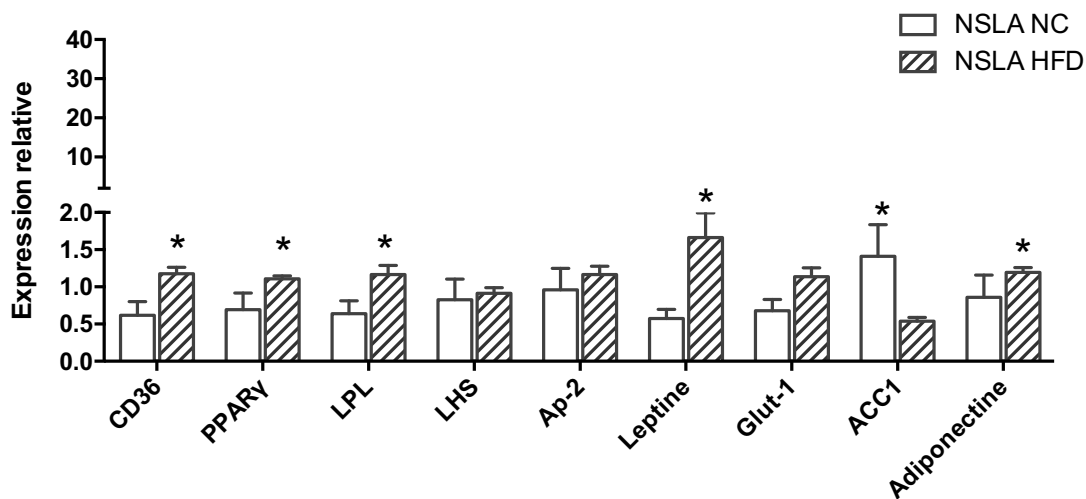
### **C. Lien entre organisation et fonction tissulaire au cours de la mise sous régime gras**

Après 8 semaines de régime gras (HFD 45%), l'organisation du TA a été analysée. De plus, l'expression de gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire et dans le métabolisme lipidique, en plus des gènes précédemment étudiés dans l'article 1, a été étudiée par RT-qPCR. Pour des raisons de temps et de disponibilité du microscope confocal, l'analyse de la structure du TA a été réalisée sur des tranches épaisses (300  $\mu\text{m}$ ) du dépôt inguinal, sans reconstruction 3D du dépôt entier, c'est pourquoi les résultats sont exprimés en surface et non en volume.

Comme attendu, la mise sous régime HFD augmente de manière significative la surface totale des tranches de TA inguinal (*Fig. 42a*). En revanche, on note que la proportion SLA/NSLA n'est pas modifiée (*Fig. 42b*). En effet, la proportion de SLA après 8 semaines de régime gras est de  $11,746 \pm 1,6$  % alors qu'elle représente  $12,6 \pm 0,7$  % chez les animaux contrôles. Les deux régions SLA et NSLA réagissent donc de manière identique à une surcharge en lipides, en terme de volume. De plus, le nombre de lobules comptés dans la SLA n'est pas significativement modifié par le régime HFD (*Fig. 42c*).

*Ainsi, l'expansion du dépôt adipeux en réponse à l'HFD, n'est pas corrélée à une modification de la proportion SLA / NSLA.*

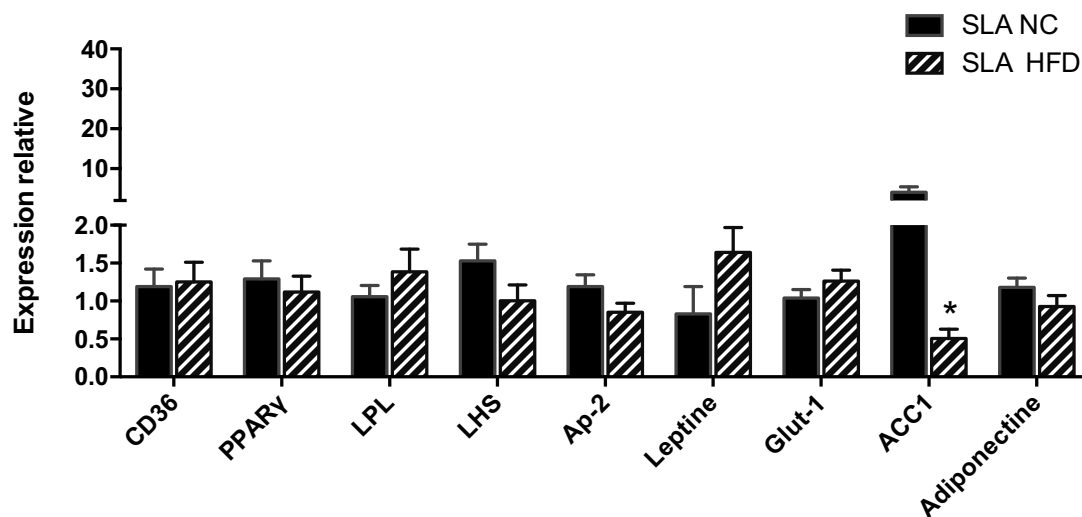
L'expansion du TA inguinal murin peut être expliqué par les données de la *figure 42d* qui montre que le régime HFD augmente le nombre de gouttelettes lipidiques dont la taille est supérieure à  $2000 \mu\text{m}^2$  (*Fig. 42d*) alors que le nombre de



**Figure 43 : Augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire et lipogenèse dans la NSLA après mise sous régime gras**

HFD : High Fat Diet; NC: Normal Chow, n=5

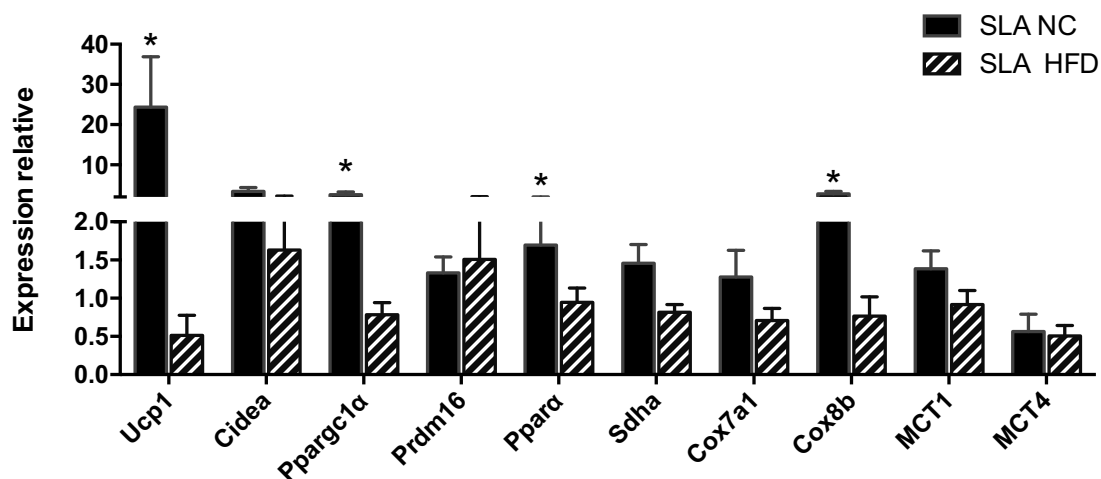
Test statistique : t-test : \* $p < 0,05$



**Figure 44 : Absence de variation de l'expression de gènes adipogéniques dans la SLA, après mise sous régime gras**

HFD : High Fat Diet; NC: Normal Chow, n=5

Test statistique : t-test : \* $p < 0,05$



**Figure 45 : Le régime gras entraîne une diminution de l'expression des gènes impliqués dans le brunissement uniquement dans la SLA**

n=5

Test statistique : t-test : \* $p < 0,05$

gouttelettes lipidiques de petite taille ( $< 1000 \mu\text{m}^2$ ) a tendance à diminuer dans la partie NSLA du TA. Ce résultat suggère donc une hypertrophie des adipocytes à l'origine de l'augmentation du volume du dépôt adipeux.

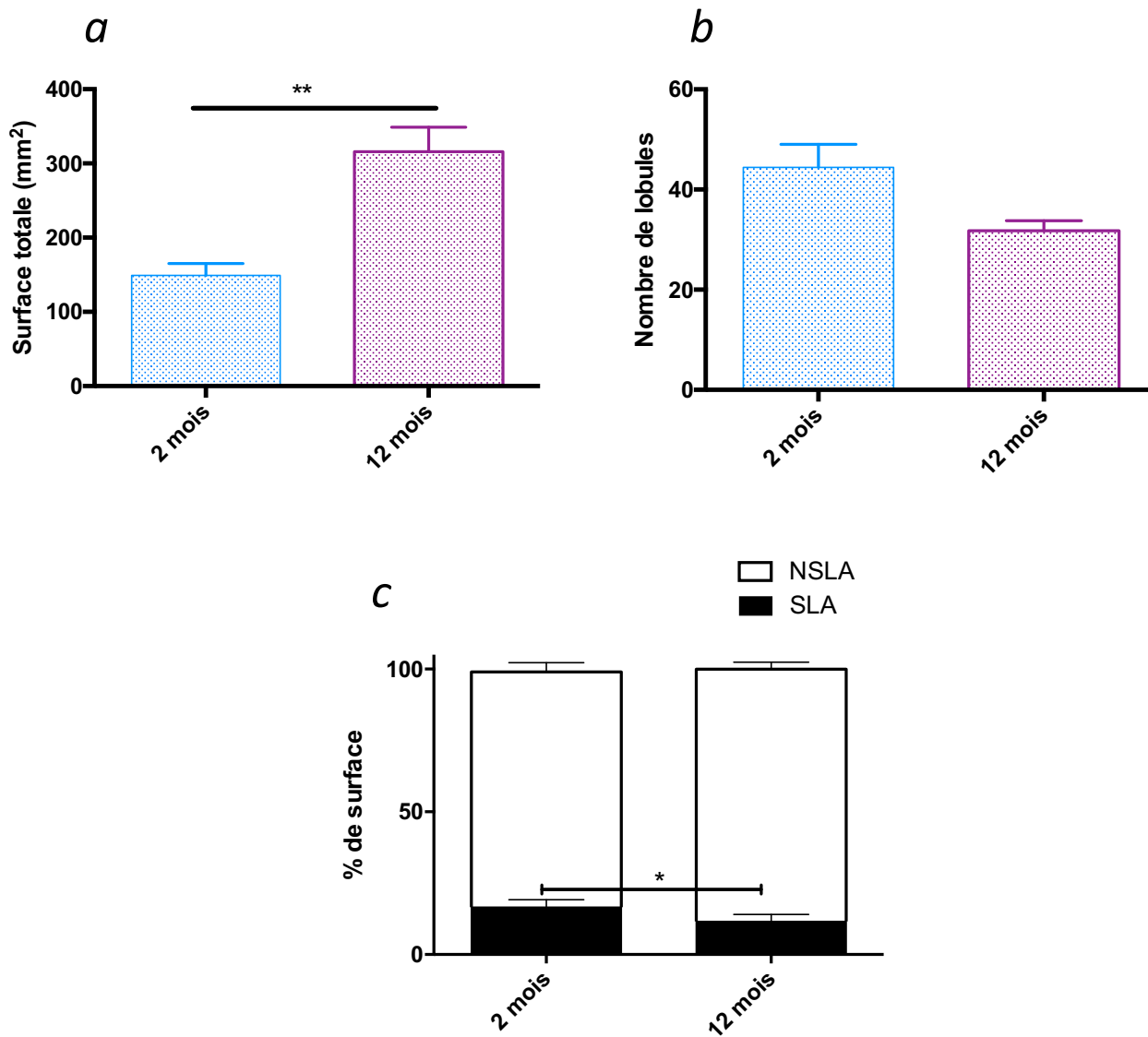
Concernant l'analyse de l'expression génique après microdissection, les résultats obtenus mettent en évidence que le TA blanc sous-cutané inguinal est encore une fois hétérogène dans sa réponse au régime HFD. On observe que l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et dans la différenciation adipocytaire (CD36 (transporteur des acides gras), PPAR- $\gamma$ , LPL, leptine, adiponectine) est significativement augmentée dans la NSLA après 8 semaines de régime HFD (*Fig. 43*) alors qu'aucune variation n'est observée dans la SLA (*Fig. 44*). Ces résultats suggèrent donc que, lors du régime gras, la lipogenèse se ferait préférentiellement à la périphérie du TA inguinal.

Il est important de noter que l'expression de la plupart des gènes du métabolisme oxydatif ou impliqués dans le « brunissement », qui est plus importante dans la SLA que dans la NSLA en situation basale (*cf article 1*), a tendance à diminuer dans la SLA après la mise sous régime gras. La diminution est significative pour Ppargc-1 $\alpha$ , Ppar- $\alpha$ , UCP-1 et Cox8b (*Fig. 45*). Aucune modification du niveau d'expression de ces gènes n'est observée dans la NSLA (donnée non montrée).

*Ces résultats mettent en évidence que le TA inguinal sous-cutané ne répond pas de manière homogène à la mise sous régime HFD, même si les deux régions s'hypertrophient. Ces résultats confirment donc les données de l'article 1 qui montrent que l'hétérogénéité structurale du TA est superposée à une hétérogénéité fonctionnelle.*

#### **D. Effet de l'âge sur l'organisation du TA inguinal**

Dans *l'article 1*, la SLA représentait 16.5% de la surface totale du TA inguinal. Cette étude a été réalisée sur des souris âgées de 8 semaines. En revanche, lorsque nous avons fait l'étude sur les conséquences du régime HFD, nos analyses ont donné une surface de la SLA (chez les animaux NC) ne représentant que 11.7% de la surface totale. Dans ce cas, les souris étaient âgées de 15 semaines soit 7 semaines de plus que celles utilisées dans *l'article 1*.



**Figure 46 : Effet de l'âge sur l'organisation du TA inguinal**

a) Augmentation de la surface totale du TA inguinal avec l'âge sans b) modification du nombre de lobules avec l'âge.  
c) Variation de la répartition SLA/ NSLA en fonction de l'âge (n=6)

Test statistique : t-test : \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$



Nous nous sommes donc demandés si l'âge avait un effet sur la proportion relative SLA/NSLA. Comme pour l'étude avec le régime HFD, l'analyse de la structure du tissu a été réalisée sur des tranches épaisses (300  $\mu\text{m}$ ) du dépôt inguinal, sans reconstruction 3D du dépôt entier.

L'analyse 2D du dépôt inguinal de souris « jeunes » (2 mois) et de souris « âgées » (12 mois) révèle que la surface totale du TA augmente significativement avec l'âge de l'animal ( $p < 0,0079$ ) (*Fig. 46a*), sans modifier significativement le nombre de lobules comptés dans la SLA (*Fig. 46b*). En revanche, l'âge modifie significativement la proportion SLA/NSLA de ce TA ( $p < 0,0317$ , *Fig. 46c*). En effet, sur des souris âgées de 12 mois, la SLA ne représente plus que  $11,5 \pm 1,091$  % du tissu total, alors qu'elle représente  $17,5 \pm 1,4$  % chez des souris âgées de 2 mois.

*Ces données révèlent que les deux régions de ce TA que l'organisation tissulaire du TA évolue au cours de la vie de l'individu.*

### **III. Discussion**

#### **A. Relation « structure / fonction » : extrapolation à d'autres TA ?**

Nos résultats montrent que le TA inguinal est loin d'être un tissu simple. Pour la première fois, nous mettons en exergue que ce tissu possède une organisation hétérogène. En effet, le cœur de ce dépôt (SLA) est structuré en lobules répartis autour du ganglion lymphatique alors qu'en périphérie (NSLA), les adipocytes ne sont pas regroupés en lobules identifiables. L'analyse de l'innervation sympathique suggère, elle-aussi, une hétérogénéité avec une innervation plus dense et plutôt « vasculaire » en périphérie, et une innervation d'avantage « adipocytaire » au cœur du dépôt. Cette hétérogénéité structurale s'accompagne d'une hétérogénéité fonctionnelle puisque ces deux régions (SLA ou cœur / NSLA ou périphérie) répondent différemment à la mise au froid et à un apport calorique accru. On peut imaginer qu'il existe des différences similaires lors d'autres « stress » physiopathologiques comme la lactation ou lors d'agression de ce tissu. De plus, des données très préliminaires du laboratoire suggèrent que d'autres dépôts adipeux (TA



mésentérique) sont aussi organisés en 2 régions (une région avec des adipocytes regroupés en lobules et une région sans lobule identifiable), alors que d'autres tissus adipeux ne le sont pas (TA périgonadique). L'ensemble de ces données renforce ainsi l'importance de nos observations et la nécessité d'une étude des TA à l'échelle tissulaire.

L'ensemble de ces résultats soulève alors plusieurs questions :

- Quelle est l'origine de ces deux régions ? Quand et comment se mettent en place ces deux régions ?
- Quel est l'avantage d'une telle organisation ?

### **B. Deux régions avec une organisation et une fonction différentes : origines différentes ?**

On peut se demander si cette dichotomie –structurale et fonctionnelle- n'est pas le résultat de la fusion de deux tissus originellement différents ? En effet, on peut imaginer, par exemple, que les progéniteurs adipocytaires (ASCs) sont différents au cœur (SLA) et en périphérie (NSLA), comme c'est le cas pour les dépôts adipeux viscéraux vs sous-cutanés <sup>59</sup>. Ainsi, les deux régions auraient une origine développementale différente associée à des fonctions tissulaires spécifiques. Comme l'a décrit Jiang et coll., au cours du développement de ce tissu, deux vagues successives de prolifération et différenciation de progéniteurs « différents » pourraient être responsables de l'hétérogénéité structurale et fonctionnelle du TA inguinal <sup>354</sup>. Ainsi, il serait intéressant d'étudier la mise en place de ce tissu au cours du développement afin de savoir si une de ces deux régions ne se met pas en place avant l'autre <sup>354</sup>. Si cette hypothèse est validée, cela expliquerait pourquoi, avec l'âge, l'une des régions (la NSLA) se développe au dépend de l'autre (la SLA) (*Fig. 46*). Ainsi, à la naissance, seule une région SLA serait en place, alors que la région NSLA se développerait au cours de la vie de l'individu.

Lors d'une mise au froid, nos données mettent en évidence que le « brunissement » se fait préférentiellement au centre du TA. On peut donc également imaginer qu'il y ait une réserve de progéniteurs beiges uniquement dans la SLA ou bien que les adipocytes blancs matures de cette région aient la capacité à se transdifférencier en adipocytes beiges alors que les adipocytes de la NSLA ne



l'auraient pas <sup>355</sup>. Ainsi, la SLA hébergerait des adipocytes qui sont majoritairement multiloculaires et qui ont la capacité d'exprimer la protéine découplante UCP1.

Dans tous les cas, ces adipocytes sont regroupés en lobules séparés les uns des autres par des septas de matrice extracellulaire (MEC) <sup>69</sup>. Des images de la vascularisation dans cette région révèlent une densité vasculaire beaucoup plus importante qu'en périphérie. Cette donnée est en accord avec l'importance de la vascularisation dans la thermogenèse <sup>96</sup>. Par ailleurs, la segmentation des images de vascularisation suggère une vascularisation propre à chaque lobule. Ceci conforte l'idée qu'un lobule correspond à une unité fonctionnelle dans ce tissu. Concernant la mise en place de cette région, on peut donc se demander si la présence de progéniteurs et/ou d'adipocytes beiges « impose » une organisation en lobules par la sécrétion d'une MEC importante à l'origine des septas et à la suite, une vascularisation importante propre à chaque lobule ou si c'est la structuration de la vascularisation qui est à l'origine de la localisation de progéniteurs et/ou d'adipocytes beiges. Un autre « acteur » à prendre en compte est la présence du ganglion lymphatique : ce dernier pourrait influencer la mise en place ou le maintien de progéniteurs particuliers ou alors favoriser les phénomènes de transdifférenciation d'un adipocyte blanc vers un adipocyte beige. On sait par exemple que les cellules immunitaires, comme les éosinophiles ou les lymphocytes innés résidents (ILC2), via une sécrétion d'IL-4 et d'IL-13 stimulent la différenciation beige <sup>356,357</sup>.

Ces résultats rappellent le principe de « mosaïque » décrit par Georges Chapouthier qui présente le monde vivant comme répondant systématiquement à deux principes : le principe de juxtaposition et le principe d'intégration. Cette théorie est valable à différents niveaux (moléculaire, cellulaire, tissulaire,...). La juxtaposition est l'accumulation d'éléments identiques (prolifération cellulaire par exemple). L'intégration est l'assemblage de plusieurs structures juxtaposées pour en faire, ici, un tissu complexe aux propriétés particulières et différentes. L'avantage de cette organisation est que : 1) chacun des sous-ensembles de la mosaïque peut agir seul (ici, la SLA lors du brunissement) et 2) l'ensemble peut être intégré pour avoir une même action commune (TA composé de deux parties, segmentable / non segmentable dont le but final est de stocker / libérer de l'énergie).

Des résultats préliminaires du laboratoire semblent montrer qu'il existe différents niveaux d'hétérogénéité puisque i) au sein d'un même lobule après une mise au froid, tous les adipocytes ne sont pas beiges et ii) tous les lobules ne brunissent pas



après. Ainsi, le lobule lui-même peut-il être considéré comme une mosaïque, à une échelle plus petite que le TA, comme c'est le cas pour le lobule hépatique ?

### **E. Régionalisation et expansion du TA**

Pour conclure, nous montrons que les deux zones du TA inguinal, différentes de par leur organisation (lobules / vascularisation / innervation), se distinguent aussi sur le plan fonctionnel : une capacité à brunir uniquement au cœur du tissu, une périphérie qui se développe avec l'âge et qui semble beaucoup plus sensible à un apport excessif de lipides (régime HFD). Il semblerait donc que les deux régions constituent des microenvironnements différents, favorables à tel ou tel type cellulaire et/ou à telle ou telle fonction. Il serait donc très intéressant d'étudier la répartition des différents types cellulaires qui composent le TA dans ces deux régions. On peut, par exemple, se poser la question de la localisation des cellules immunitaires au regard de leur implication dans le développement des maladies métaboliques qui se caractérisent par un développement massif des TA<sup>358</sup>. On pourrait ainsi imaginer que les cellules immunitaires pro-inflammatoires (responsables de l'inflammation de bas bruit) se localisent préférentiellement dans la partie périphérique (la NSLA), partie où l'on observe une hypertrophie des adipocytes et une augmentation de l'expression des gènes adipogéniques et lipogéniques en réponse à un régime riche en gras.

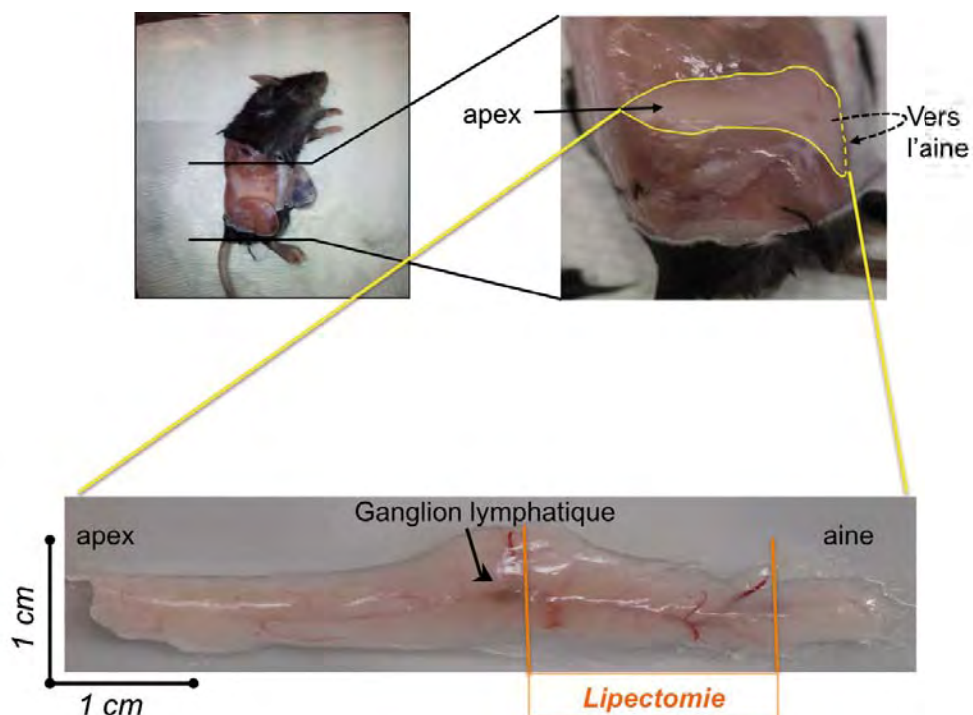


Figure 47 : Repères anatomiques pour la réalisation de lipéctomie

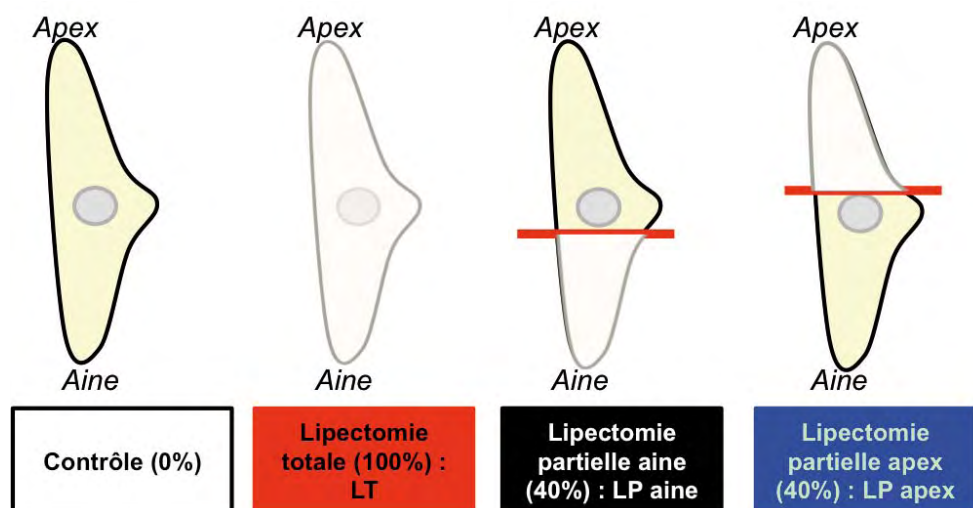


Figure 48 : Mise en place du modèle de lipéctomie



# **Chapitre 2 :**

## ***Etude de la réparation du TA inguinal murin après ablation massive : le rôle des opioïdes***

### **I. Introduction**

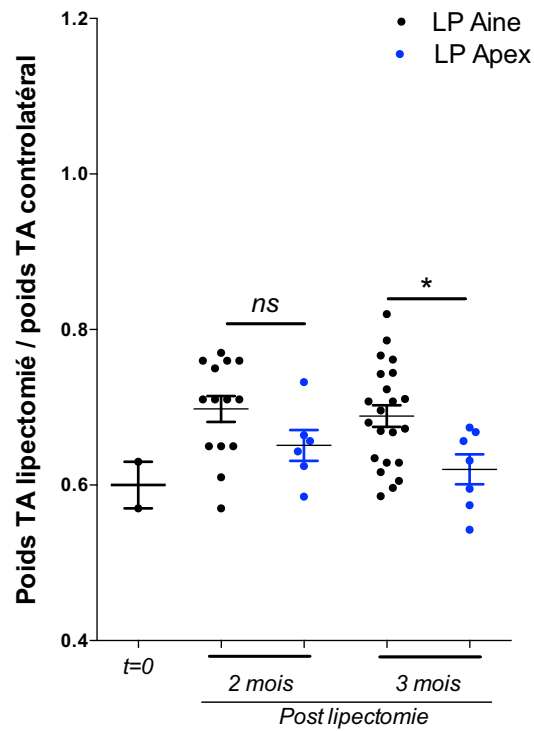
Le TA est « plastique » mais ne semble pas régénérer. En effet, nous avons vu dans l'introduction qu'après ablation, un dépôt adipeux ne régénère pas. En revanche, la masse adipeuse totale (c'est-à-dire, l'organe adipeux) reste constante : une compensation par l'ensemble des autres dépôts adipeux se met en place <sup>111</sup>. Ces observations sont compatibles avec le fait qu'après lésion tissulaire, les mammifères adultes cicatrisent contrairement aux vertébrés inférieurs qui, eux, régénèrent <sup>359</sup>. Parallèlement à cela, les souris MRL sont connues comme étant un des rares mammifères dotés de la capacité de régénérer <sup>220</sup>. Nous avons donc décidé de comparer les mécanismes de réparation tissulaire (cicatrisation / régénération) en réponse à une ablation, du TA inguinal murin chez la souris C57BL/6 et chez d'autres souches telles que la MRL.

#### **A. Mise en place du modèle de lipectomie**

Pour étudier la capacité du TA inguinal à régénérer, nous avons d'abord mis en place un modèle de lipectomie. Ce dépôt est de forme allongée (entre 2 et 3 cm de long sur 1cm de large) et aplatie (entre 1 et 2 mm d'épaisseur). Il est situé entre la peau et la paroi musculaire abdominale. Anatomiquement, il peut être décrit en 3 parties (*Fig. 47*) :

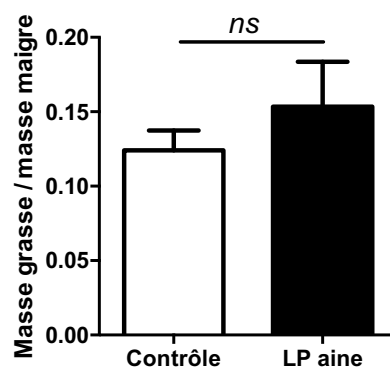
- i) Une partie « apex » reliée dans le dos aux muscles.
- ii) Une partie « aine », au creux de l'aine.
- iii) Une partie centrale renfermant un ganglion lymphatique.

Trois sortes de lipectomies ont été testées chez la souris C57BL/6 : une ablation totale (LT), une ablation massive (40% du poids du TA, soit environ 40 mg de tissu adipeux) réalisée soit côté « aine » (LP aine), soit côté « apex » (LP apex) (*Fig. 48*).



**Figure 49 : Evolution du poids du TA lipectomié en fonction des deux types de lipectomie partielle**

Test ANOVA : NS : Non significatif, \* $p < 0,05$ .



**Figure 50 : Le rapport masse grasse / masse maigre n'est pas modifié, 2 mois après la lipectomie partielle à l'aîne**

n=12

t-test : NS : Non significatif

Dans les deux cas d'ablation partielle, il est important de souligner que le ganglion lymphatique n'a pas été enlevé.

Pour pouvoir quantifier la repousse du TA, le choix a été fait de mesurer, à différents temps après la lipectomie, le poids du dépôt adipeux et d'exprimer les résultats en faisant le rapport « poids du TA lipectomié / poids du TA controlatéral non lipectomié » (Fig. 49). Ce rapport est de  $0.6 \pm 0,03$  juste après la lipectomie alors qu'il est de  $1 \pm 0,02$  avant l'ablation. Aucune repousse de TA n'a été observée chez les animaux ayant subi une lipectomie totale, et ce quel que soit le temps étudié (1-6 mois) (données non montrées). Concernant les lipectomies partielles, une repousse partielle du TA lipectomié est observée dans le cas d'une lipectomie partielle côté aine (LP aine) (Fig. 49). En revanche, lorsque l'ablation est réalisée côté « apex », aucune repousse n'est observée (Fig. 49).

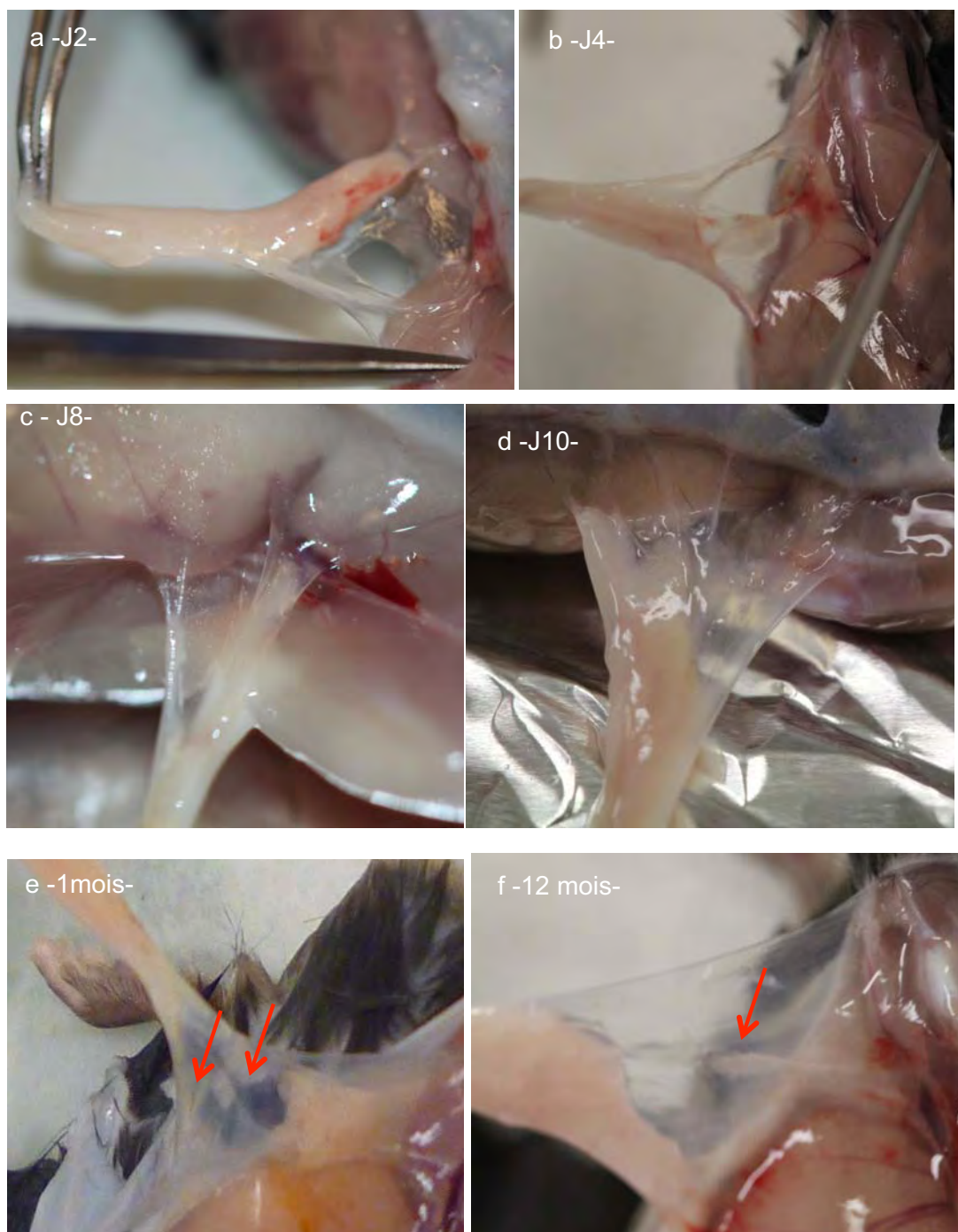
Pour la suite de notre travail, nous nous sommes focalisés sur le modèle de lipectomie partielle réalisée côté « aine », désormais noté « LP ».

Par EchoMRI, nous avons évalué le rapport masse grasse sur masse maigre des souris, deux mois après lipectomie partielle. A deux mois, même si le TA lipectomié ne récupère pas son poids initial (rapport du poids du dépôt lipectomié sur le poids du dépôt controlatéral  $< 1$ , Fig. 49), le rapport masse grasse/masse maigre de l'animal lipectomié est identique à celle de souris contrôles (Fig. 50). Le rapport masse grasse / masse maigre est égal à  $0,12 \pm 0,02$  chez la souris contrôle alors qu'il est de  $0,15 \pm 0,03$ , 2 mois après lipectomie. Il est important de noter que le TA controlatéral (TA inguinal non lipectomié) issu d'une souris lipectomisée a le même poids que le TA controlatéral d'une souris non lipectomisée. Ainsi, le controlatéral ne compense pas (données non montrées).

*En accord avec les données de la littérature, ces résultats d'EchoMRI suggèrent donc qu'une compensation par les autres dépôts adipeux (excepté le controlatéral inguinal) est sûrement mise en place et assure un poids constant pour l'ensemble du corps adipeux<sup>111</sup>.*

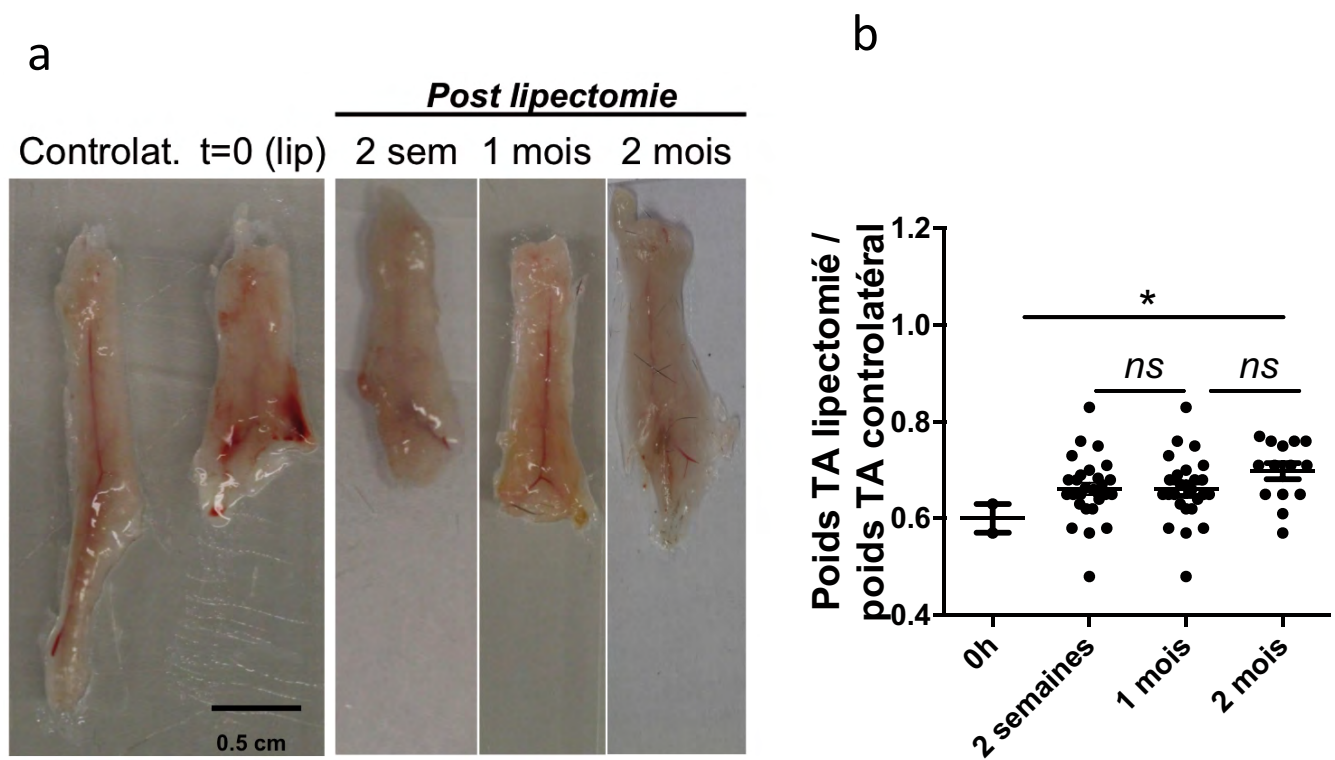
#### *1. Une « enveloppe conjonctive » apparaît sur le site de la lipectomie*

A l'occasion des sacrifices des animaux, nous avons observé qu'une semaine après lipectomie, certains TA lipectomisés présentaient une « enveloppe conjonctive ». Cette enveloppe conjonctive apparaît dès le deuxième jour après la lipectomie



**Figure 51 : Mise en place d'une enveloppe conjonctive à différents temps après la lipectomie**

- a) J2 : l'enveloppe est très fragile et n'est présente que chez 1 animal sur 6 ;
- b) J4 : l'enveloppe est un peu moins fragile et est présente chez 3 animaux sur 6 ;
- c) J8 : l'enveloppe est moins fragile et est présente chez 3 animaux sur 6 ;
- d) J10 : l'enveloppe est présente et bien ancrée et est présente sur 5 animaux sur 6.
- e) et f) Cette enveloppe ne se remplit pas d'avantage 1 mois (e) ou 12 mois (f) après lipectomie (flèche rouge : foci d'adipocytes).

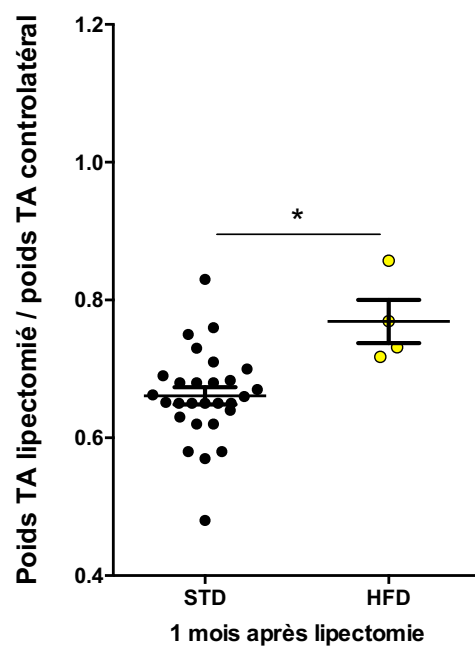


**Figure 52 : Evolution du TA chez la C57BL/6 après lipectomie partielle**

a) Evolution macroscopique

b) Quantification par le rapport TA lipectomé / TA controlatéral.

Test statistique : ANOVA : NS :Non significatif, \* $p < 0,05$ .



**Figure 53 : Le régime gras améliore la récupération du poids du TA lipectomé**

HFD : High Fat Diet, STD : Standard Diet

Test statistique : *t*-test : \* $p < 0,05$ .

(Fig. 51a) : cette dernière est fragile et n'est présente que chez 16% des animaux. C'est seulement après 8 jours que cette enveloppe conjonctive devient résistante. Elle est présente chez 50% des animaux à J8, et 80% des animaux à J10 (Fig. 51c et 51d). 2 semaines après la lipectomie, toutes les souris présentent cette enveloppe. Un mois après la lipectomie, cette enveloppe commence à se remplir et présente de petits espaces « laiteux » (Fig. 51e), faisant penser à de petits regroupements d'adipocytes. Cependant, au-delà d'un mois, nous n'observons jamais de « remplissage total » de cette enveloppe, et ce même, un an après la lipectomie (Fig. 51f).

En conclusion, chez la souris C57BL/6, il n'y a donc pas de régénération à l'échelle macroscopique (Fig. 52a). Ceci est confirmé par la mesure du rapport du poids du TA lipectomié sur celui du TA controlatéral (Fig. 52b), et ce même, 2 mois après la lipectomie.

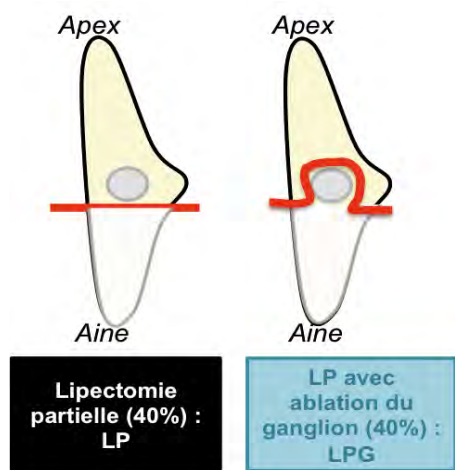
*On peut donc penser qu'après l'ablation, un processus s'initie (mise en place d'une enveloppe qui commence à se remplir d'adipocytes) mais ne peut aboutir à une régénération complète.*

## *2. Effet du régime gras sur la repousse du TA*

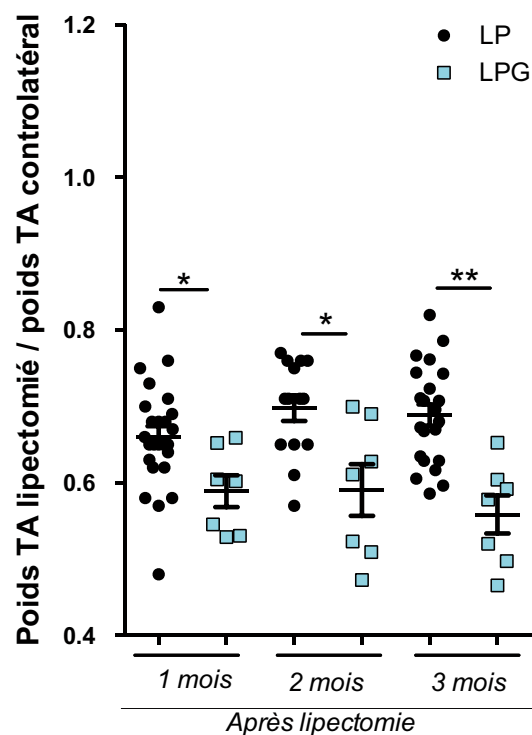
Au regard du rôle du TA dans le stockage des lipides, nous avons cherché à savoir si la mise sous régime gras pouvait favoriser la régénération de ce tissu en augmentant l'apport de lipides.

Pour répondre à cette question, nous avons donc soumis nos souris à 5 semaines de régime riche en gras (HFD 45%, 1 semaine avant la lipectomie puis 4 semaines après la lipectomie). On observe que le rapport TA lipectomié / tissu controlatéral est supérieur, 1 mois après la lipectomie, chez les souris HFD par rapport aux souris sous régime standard, suggérant une « meilleure » repousse du TA (Fig. 53). Cependant, d'un point de vue macroscopique, le TA lipectomié présente une enveloppe conjonctive vide d'adipocyte. Ainsi, suite à l'augmentation de l'apport en lipides, il est donc probable que la partie restante du TA stocke d'avantage et grossisse sans pour autant récupérer sa forme initiale. Il n'est donc pas possible de parler de « régénération ».

a



b



**Figure 54 : Comparaison entre les lipectomies aine (LP) et lipectomies aine avec ablation du ganglion (LPG)**

a) Modèle de lipectomie

b) Quantification du poids du TA lipectomé / TA controlatéral

Test statistique : ANOVA : \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$



## **B. Importance du système immunitaire dans la repousse du TA**

### *1. Importance du ganglion lymphatique*

Le TA inguinal murin renferme un ganglion lymphatique. Ce ganglion lymphatique héberge un grand nombre de cellules immunitaires. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les cellules immunitaires jouent un rôle prépondérant dans les processus de régénération <sup>169</sup>. Nous nous sommes demandés si la présence du ganglion lymphatique pouvait interférer avec une potentielle capacité à régénérer ou pas de ce dépôt adipeux.

Pour ce faire, nous avons évalué la conséquence du retrait du ganglion lymphatique lors de la lipectomie partielle (« LPG », *Fig. 54a*). Il est important de noter que la quantité de TA enlevé est identique dans les deux conditions de lipectomie : « LP » et « LPG ». On observe que dans le modèle de lipectomie « LPG », le rapport poids du TA lipectomié / poids du TA controlatéral n'évolue pas au cours du temps et reste aux alentours de 0,6 (rapport identique à celui mesuré le jour de l'ablation) (*Fig. 54b*), 1, 2 et 3 mois après lipectomie. En revanche, comme observé dans les *figures 49* et *52*, ce rapport augmente et tend vers 0,8, lors de la lipectomie « LP ».

*Ces résultats suggèrent donc que le ganglion lymphatique, et donc vraisemblablement les cellules immunitaires qu'il contient, jouent un rôle dans la récupération du poids du TA.*

### *2. Lipectomie sur différentes souches de souris présentant des déficits / pathologies immunitaires*

Pour comprendre le rôle des cellules immunitaires dans la régénération du TA inguinal, nous avons évalué les capacités du TA à régénérer chez différentes souches de souris présentant un statut immunitaire altéré. Pour ce faire, nous avons réalisé des lipectomies sur des souris nude (nu/nu), des souris NSG, et des souris MRL/MpJ (MRL).

Les souris nu/nu possèdent l'ensemble des cellules immunitaires mais les lymphocytes T ne sont pas matures. Les souris NSG sont, elles, dépourvues à la fois en lymphocytes T, B, et NK matures. Ainsi, les souris NSG ne peuvent pas développer de réponse immunitaire à médiation cellulaire et humorale. Les souris NSG sont considérées comme les souris les plus immunodéprimées existantes.

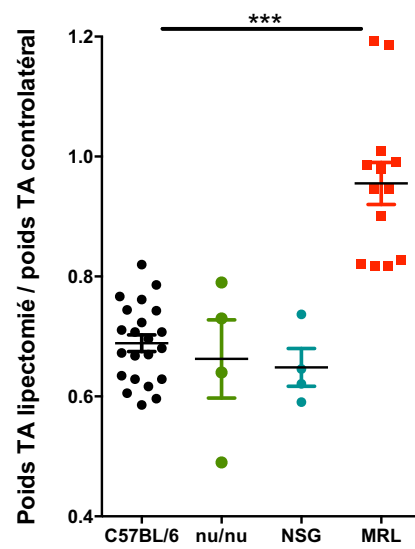
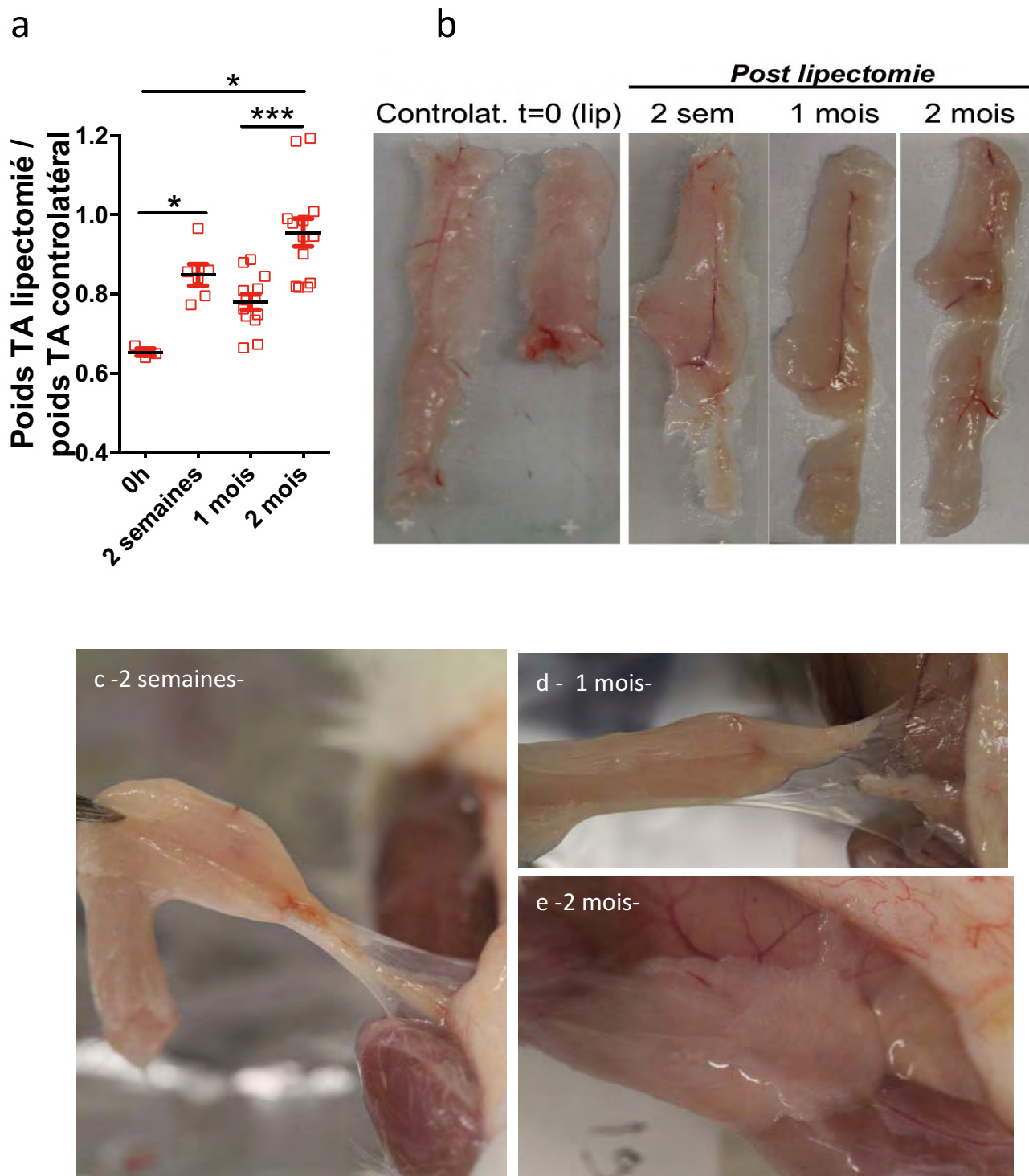


Figure 55 : Seule la souche de souris MRL régénère son TA, 2 mois après lipectomie

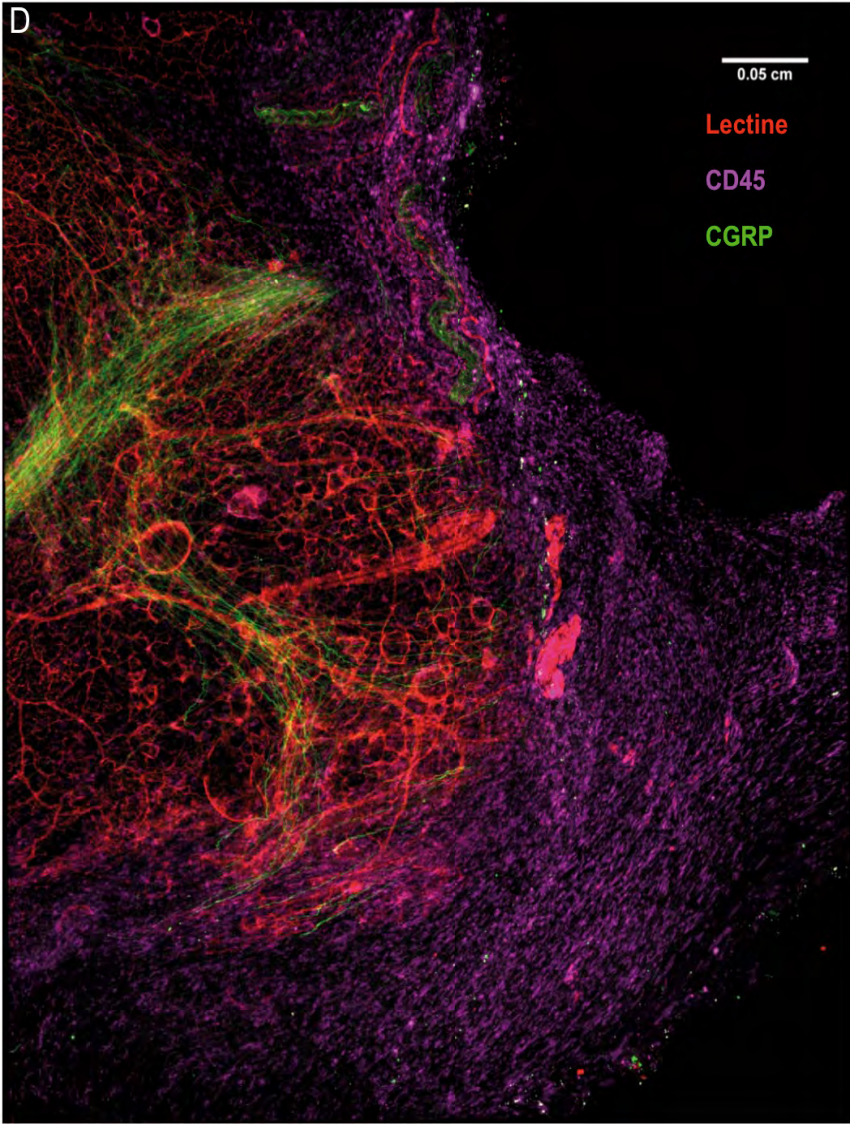
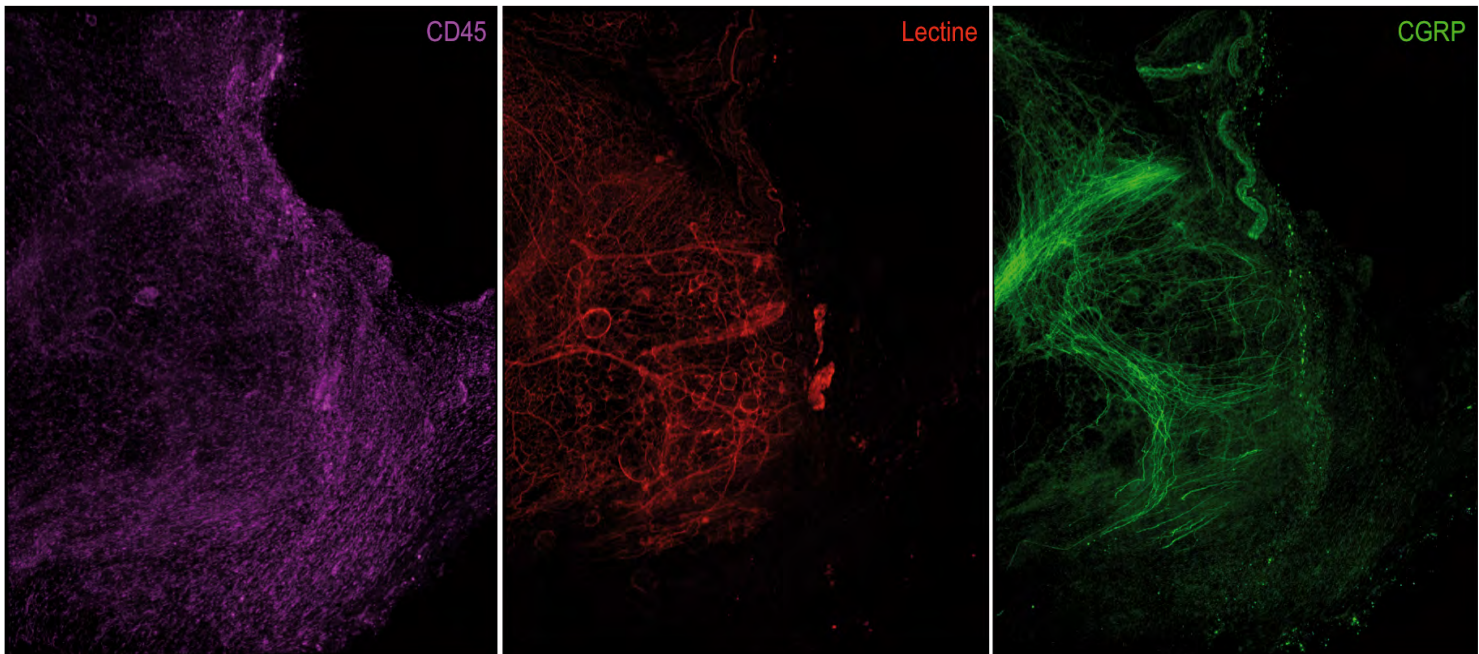


**Figure 56 : Régénération du TA chez la souris MRL**

a) Rapport TA Régénération macroscopique

c, d, e) L'enveloppe conjonctive se remplit progressivement d'adipocytes à 2 semaines, 1 et 2 mois après la lipectomie.

Test statistique : ANOVA : \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$



**Figure 57 : 2 semaines après la lipectomie, le front de lésion présente une organisation particulière chez la souris MRL**

Vascularisation (Lectine, rouge); cellules immunitaires (CD45, magenta); innervation afférente sensorielle (CGRP, vert)

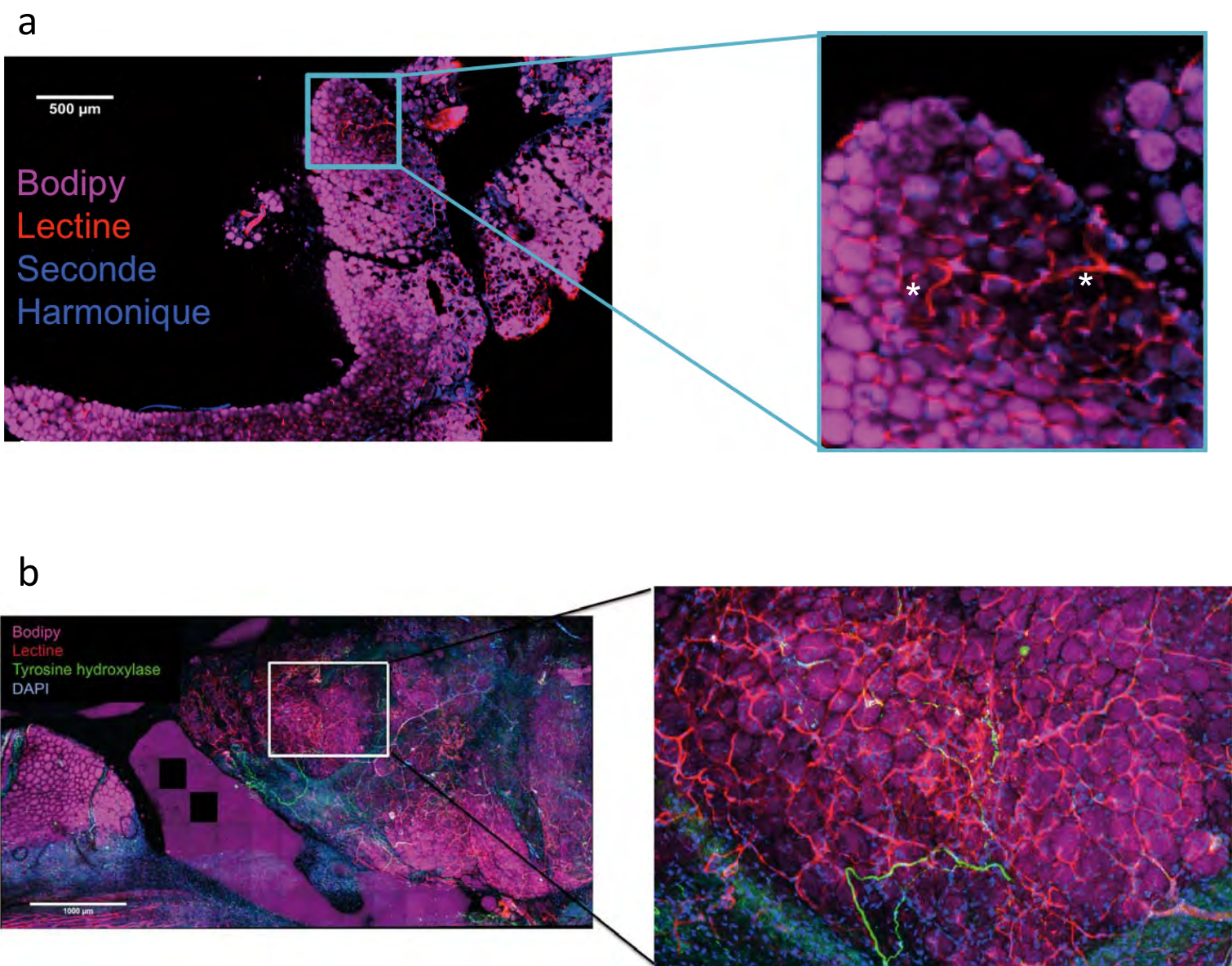


Que ce soit avec les souris nu/nu ou les souris NSG, on n'observe pas de différence en terme de récupération du poids du TA lipectomié par rapport aux souris C57BL/6 (*Fig. 55*).

*Il semble donc que les cellules immunitaires adaptatives ne sont pas impliquées dans la régénération puisque l'absence de ces cellules n'a pas d'influence sur la régénération. Nous nous attendions à observer une amélioration de la régénération chez les souris nu/nu et NSG par rapport aux C57BL/6 (cf Introduction, Chapitre 2, Fig. 28). En effet, au regard de ce qui se passe chez la salamandre, l'immunité adaptative du mammifère (Lymphocytes T, B, NK) aurait pu être un frein à la régénération chez le mammifère en mettant en place une réponse immunitaire contre les cellules se mettant en place dans la blastema du mammifère<sup>359</sup>. Il est important de noter que des mécanismes de compensation ont pu être mis en place chez ces souris, nous empêchant de conclure sur la réelle implication de ces cellules au cours de la repousse du TA inguinal, chez la souris.*

La souris MRL présente une pathologie auto-immune dont la résultante est un lupus érythémateux. Avec la souris ACOMYS, c'est la seule souche de souris montrant des capacités de régénération impressionnantes<sup>220,222,223</sup>. En accord avec la littérature, on observe que 2 mois après la lipectomie, le rapport poids du TA lipectomié / poids du TA controlatéral est de  $0,96 \pm 0,04$  chez les MRL alors qu'il n'est que de  $0,65 \pm 0,01$  chez les souris C57BL/6 (*Fig. 56*). Il est important de noter que la récupération du poids du tissu est associée à la récupération d'une morphologie quasi-identique à celle du dépôt avant la lipectomie. Cette capacité à régénérer est observable et mesurable dès 2 semaines après la lipectomie (*Fig. 56a et 56b*). Chez la souris MRL, une enveloppe apparaît et se remplit progressivement d'adipocytes (*Fig. 56 c, d, et e*).

Deux semaines après la lipectomie, on observe, sur le front de lésion du dépôt lipectomié, une structure que l'on pourrait qualifier de blastema. En effet, le front de lésion se caractérise par une importante accumulation de cellules immunitaires (cellules CD45-positives), juste derrière laquelle, on observe un réseau vasculaire (marquage lectine) et nerveux (fibres sensorielles CGRP-positives) très dense et non structuré, contrairement de ce qui est observé dans le TA adulte (*Fig. 57*). Il convient de noter qu'une telle organisation n'a jamais été observée chez la souris C57BL/6.



**Figure 58 : 2 mois après lipectomie, régénération du TA chez la souris MRL**

- a) Le tissu régénéré présente des adipocytes (bodipy, magenta), avec peu de matrice de collagène (seconde harmonique, bleu). Ce tissu régénéré est vascularisé (lectine : rouge, \*),  
 b) Ce tissu est également innervé (Tyrosine Hydroxylase : vert) (n=2).

*Innervation et vascularisation semblent donc suivre les cellules immunitaires CD45-positives. Ce grand nombre de cellules CD45 fait penser à une véritable « cape de régénération ». Il est impossible de discerner, ici, qui de l'innervation sensorielle ou de la vascularisation guide l'autre mais, on sait qu'au cours du développement, ces deux composantes se développent ensemble puisque il est décrit que l'innervation sensorielle précède le recrutement des progéniteurs endothéliaux. Il est ensuite décrit que l'innervation sympathique se met en place suivi par l'angiogenèse<sup>360</sup>.*

Deux mois après la lipectomie, la partie du TA qui a régénéré présente de très nombreux adipocytes volumineux et probablement uniloculaires (marquage bodipy). Certains de ces adipocytes sont regroupés en lobules séparés par des travées de matrice extracellulaire (génération de la seconde harmonique qui révèle les signaux harmonophores et donc les dépôts de collagènes) (*Fig. 58a*). De plus, le TA régénéré présente une vascularisation (marquage lectine) et une innervation sympathique (marquage de la TH) identiques à celles observées dans un tissu inguinal adulte (*cf Production Scientifique, chapitre I, Innervation*) (*Fig. 58b*).

Au regard des résultats obtenus jusqu'ici, nous avons alors décidé de focaliser notre étude sur les souris C57BL/6 et les souris MRL en étudiant les différences entre ces deux souches de souris, permettant d'expliquer la possibilité ou non de ces souris à régénérer leur TA inguinal suite à une ablation partielle.

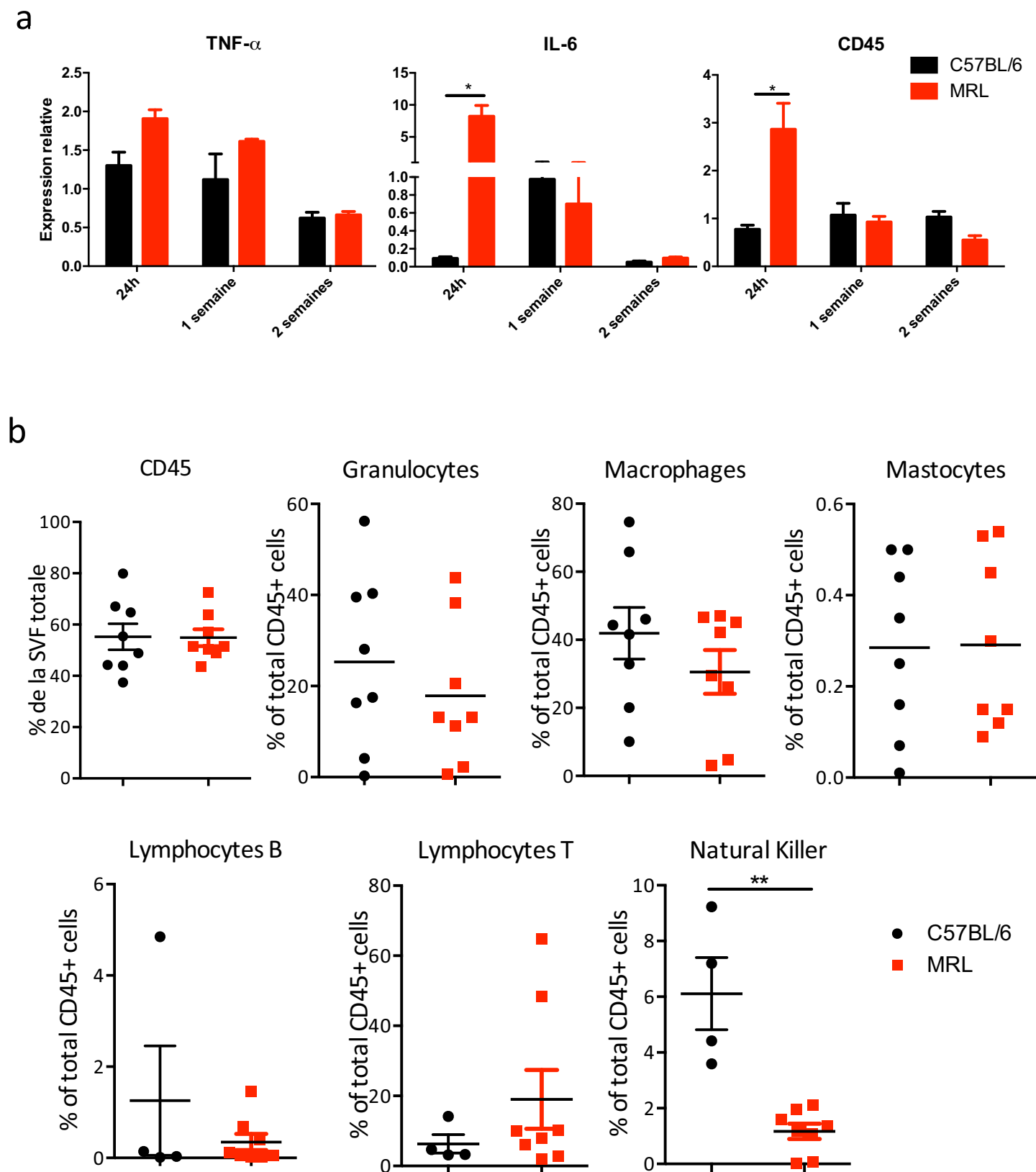
### *3. Etude comparée des souris C57BL/6 et MRL*

Nous avons évalué à la fois la réponse inflammatoire en réponse à la lipectomie et l'apparition d'une fibrose ou non chez ces deux souches de souris.

#### *a) Caractérisation de la phase inflammatoire*

Nous avons, dans un premier temps, analysé l'expression génique de différentes cytokines pro-inflammatoires au niveau du front de lésion (24h après lipectomie), puis dans la partie régénérée (1-2 semaines après lipectomie).

24h après la lipectomie, l'expression de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$  est augmentée significativement chez les souris MRL par rapport aux souris C57BL/6 (*Fig. 59a*). Ces résultats sont cohérents avec l'augmentation de l'expression du CD45, pouvant



**Figure 59 : Comparaison de la réponse inflammatoire 24h après la lipectomie chez les souris MRL et C57BL/6**

a) Niveau d'expression génique (n=6)

b) Analyse du pourcentage des différentes populations immunitaires par cytométrie en flux

Test statistique : ANOVA : \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$



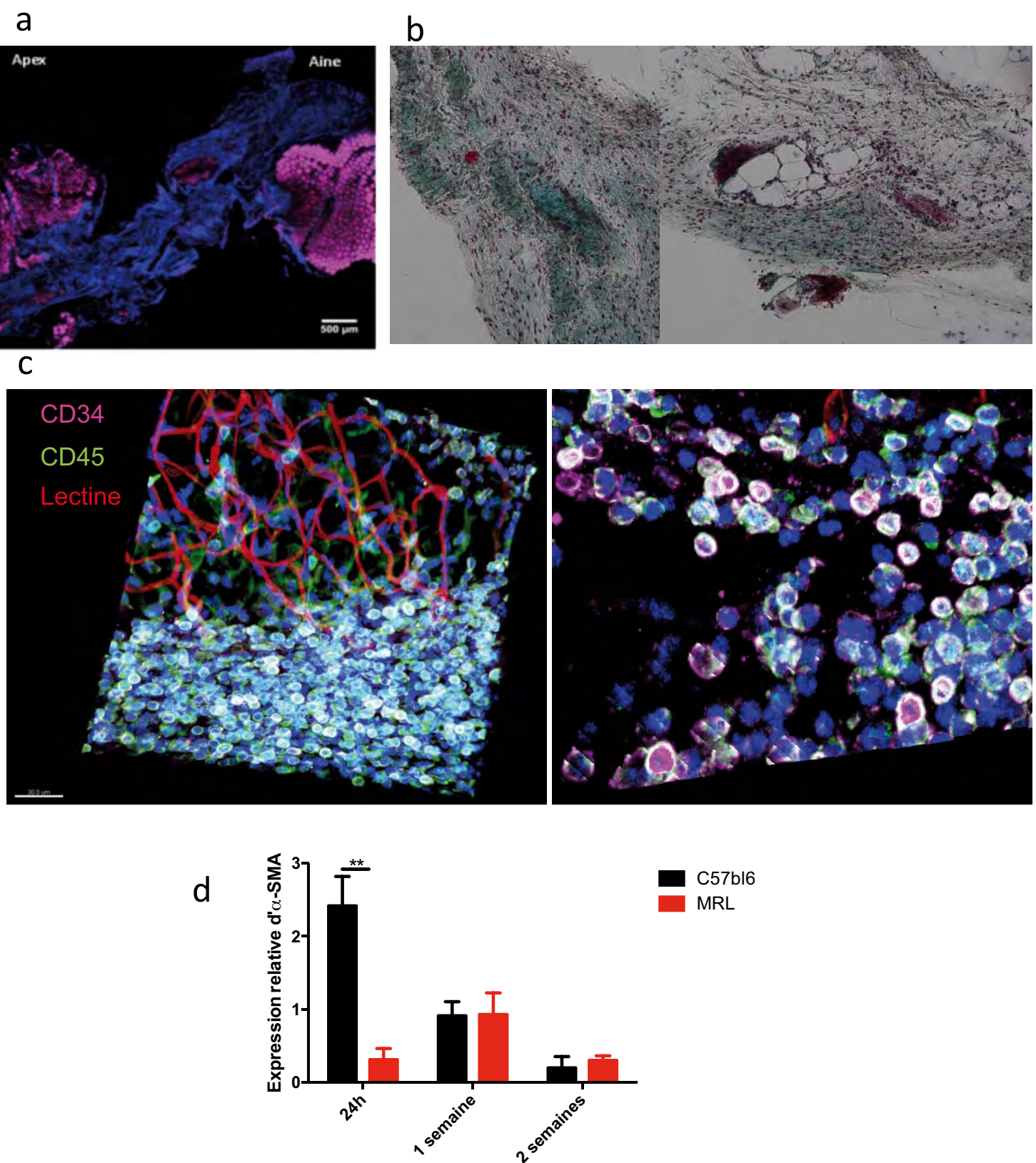
refléter une augmentation du nombre de cellules immunitaires (*Fig. 59a*). L'analyse du niveau d'expression des cytokines anti-inflammatoires, comme l'IL-4 ou l'IL-13, ne révèle aucune différence aux temps courts comme aux temps longs entre les deux souches de souris (données non montrées). Ces résultats suggèrent une réponse inflammatoire plus importante 24h après la lipectomie chez la souris MRL par rapport à la souris C57BL/6.

Nous avons alors analysé les populations cellulaires immunitaires, 24h après la lipectomie, par cytométrie en flux. Cette étude ne montre cependant pas de différence entre les deux souches de souris, que ce soit en terme de nombre de cellules (données non montrées) ou en pourcentage de cellules CD45-positives (*Fig. 59b*). Il n'y a pas non plus de différence dans le pourcentage de granulocytes, de macrophages, de mastocytes, de lymphocytes B et de lymphocytes T (*Fig. 59b*). En revanche, le pourcentage de cellules NK est significativement augmenté 24h après la lipectomie chez les souris C57BL/6 par rapport aux souris MRL (*Fig. 59b*).

Ces données peuvent paraître non cohérentes avec l'analyse des modifications d'expression génique étudiée précédemment. Pour l'analyse des populations cellulaires par cytométrie en flux, nous avons pris l'ensemble du TA, à la différence de l'analyse de l'expression génique où nous avons travaillé uniquement sur la zone de lésion. Cette différence de quantité de TA prélevé peut expliquer l'absence de différence observée avec les populations de cellules immunitaires.

Le même type de phénotypage a été réalisé 1 semaine, 2 semaines, 1 et 2 mois après la lipectomie. De nouveau, aucune différence significative a été observée entre les deux souches de souris (données non montrées).

Il serait intéressant de réaliser les mêmes observations à des temps plus courts (3h-6h-12h) ou intermédiaires (48h-72h-96h). En effet, d'après la littérature, il semblerait que les cellules immunitaires impliquées dans la phase inflammatoire arrivent sur la zone de lésion bien avant 24h alors que la phase anti-inflammatoire (ou résolution de l'inflammation) débute après 48h. Néanmoins, nous sommes confrontés au problème de la quantité de tissu (et donc de cellules) que l'on peut prélever. Une optimisation de nos techniques de prélèvement et de marquage est donc nécessaire.



**Figure 60 : Mise en place d'une fibrose chez la souris C57BL/6**

a) Mise en place d'un tissu fibrotique chez la souris C57BL/6, 2 mois après la lipectomie. Adipocytes (Bodipy, magenta) ; matrice extra cellulaire (Seconde Harmonique : bleu) (n=2).

b) Coloration au trichrome de Masson de l'enveloppe : accumulation de collagène (vert, bleu), noyau (brun).

c) Présence de cellules CD45+ et CD34+ sur le front de lésion de TA inguinal de C57BL/6, 24h post lipectomie. Lectine : rouge : vascularisation, CD45 : magenta : cellules immunitaires et CD34 : vert : ASCs, n=2.

d) 24h post lipectomie, l'expression génique d'alpha-SMA est 2,5 fois plus grande chez les C57BL/6 que chez les souris MRL, n=6

Test statistique : ANOVA : \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$

#### b) Apparition d'une fibrose chez la souris C57BL/6

Vingt-quatre heures après la lipectomie, nous observons, chez la souris C57BL/6, une accumulation de cellules immunitaires CD45-positives sur le front de lésion (*Fig. 60b et 60c*). En arrière de ces cellules, on observe la présence d'une vascularisation organisée comme dans un tissu adipeux adulte. De manière surprenante, une proportion importante de ces cellules CD45-positives sont aussi CD34-positives. Classiquement, le CD34 est un marqueur d'ASCs, alors que ces cellules ne portent pas le CD45. Il est décrit dans la littérature, l'existence de cellules comme étant positives pour le CD34 et CD45 : on les nomme fibrocytes<sup>133</sup>. Ces fibrocytes sont décrits comme des cellules activées après une lésion, et dont l'activation entraîne une sécrétion massive de collagène à l'origine de la fibrose<sup>133-135</sup>. Ces cellules se caractérisent par une morphologie de fibroblastes, c'est à dire des cellules préférentiellement allongées avec des proto-filaments<sup>133</sup>. Cette morphologie n'est, néanmoins, pas observée dans nos conditions.

Par ailleurs, 24h après la lipectomie, le niveau d'expression de l' $\alpha$ -SMA est significativement plus important chez la souris C57BL/6 que chez la souris MRL (*Fig. 60d*). L' $\alpha$ -SMA est un marqueur des cellules musculaires lisses mais est également décrit comme un marqueur de myofibroblastes / fibrocytes<sup>133</sup>. Ces données suggèrent donc la présence de potentiels fibrocytes 24h après la lipectomie, chez la souris C57BL/6 et non chez la souris MRL.

Deux mois après la lipectomie, l'imagerie sur le TA par microscopie biphotonique met en évidence une présence, en grande quantité, de fibres de collagène. Cette dernière est mise en évidence par le signal de seconde harmonique (*Fig. 60a et b*).

Dans l'introduction, nous avons souligné l'importance des métalloprotéases (MMP) et de leurs inhibiteurs (TIMP) dans les processus de fibrose et régénération<sup>140 142 361 137</sup>. De manière très intéressante, dans notre modèle, on observe une grande différence quant au niveau d'expression des MMPs et de leurs inhibiteurs entre les souris C57BL/6 et les souris MRL. En effet, on observe que la balance MMP-9 et TIMP-1 est différente 24h après la lipectomie : la souris MRL présente une forte expression de TIMP-1, alors que la souris C57BL/6, au contraire, présente une faible expression de TIMP-1, pour des niveaux d'expression de MMP9 identiques



(Fig. 61a, b). Une et 2 semaines après la lipectomie, cette différence entre les souris C57BL/6 et MRL a disparu.

Nous avons également analysé l'expression de molécules impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuse de 24h à 2 semaines post-lipectomie : Snail-1, Vimentine et Collagène de type I pour les marqueurs mésenchymateux ; Collagène IV et E-cadhérine pour les marqueurs épithéliaux (donnée non montrée). Seule, l'expression de Snail-1 est significativement augmentée chez la souris MRL, 24h après la lipectomie (Fig. 61 c, d, e et f).

*Après lipectomie, les souris MRL et C57BL/6 ne répondent donc pas de la même manière : **Le TA des souris C57BL/6** semble présenter une fibrose 2 mois après la lipectomie (accumulation de collagène observée en microscopie biphotonique et par coloration au trichrome de Masson). La mise en place de cette fibrose pourrait être due à la présence de fibrocytes sur la zone de lésion, dès 24h après la lipectomie (imagerie confocale et expression génique) (Fig. 60). **Le TA de souris MRL** régénère puisqu'on observe une re-vascularisation, une ré-innervation et des adipocytes qui s'organisent en lobules, 2 mois après la lipectomie (Fig. 58). Cette régénération peut être corrélée à une inflammation plus importante chez la souris MRL par rapport à la souris C57BL/6 (augmentation de l'expression génique d'IL-6 et TNF- $\alpha$ ), 24h après la lipectomie (Fig. 59). Cette réponse inflammatoire plus importante serait due à une activation des cellules immunitaires et non à un nombre de cellules plus grand (pas de modification du pourcentage de cellules immunitaires, excepté une diminution de lymphocytes T NK) (Fig. 59). De plus, une organisation particulière du front de lésion a été observée uniquement chez la souris MRL avec une dense vascularisation associée à une innervation sensorielle très dense à l'arrière d'un « front de migration » de cellules CD45 positives (Fig. 57).*

*Nos données mettent donc en évidence, qu'à différents temps après la lésion, les deux souches de souris ont des réponses différentes (inflammation, innervation, remodelage tissulaire) pouvant être à l'origine des différences de réparation tissulaire (cicatrisation ou régénération).*

## II. Article 2

# Endogenous opioids control adipose tissue regeneration via reactive oxygen species generation

Subtitle: Opioids control adipose tissue regeneration

Labit E<sup>1</sup>, Dromard C<sup>1</sup>, Guissard C<sup>1</sup>, Luche E<sup>1</sup>, Rabiller L.<sup>1</sup>, Carriere-Pazat A<sup>1</sup>, Barreau  
C<sup>1</sup>, Andre M<sup>1</sup>, Cuminetti V, Sengenès C<sup>1</sup>, Cousin B<sup>1</sup>, Mithieux G<sup>2</sup>, Lorsignol A<sup>1</sup>,  
Casteilla L<sup>1</sup>

<sup>1</sup>; UMR STROMALab; Université de Toulouse 3; CNRS 5273; EFS Pyrénées-Méditerranée; INSERM U1031; INSERM U1048 ; BP 84225, F-31432 Toulouse Cedex 4, France.

Keywords : adipose tissue, regeneration, opioids, reactive oxygen species, MRL

## **Abstract**

Adipose tissue (AT) is classically removed or injected in patients for reconstructive and plastic surgeons, although its true regenerative capabilities are poorly documented. Whatever the tissue that is affected, post-injury consequences depend on the management of inflammation and in mammals, injury is almost associated with wound healing and fibrosis but not regeneration. Among the modulators of inflammation, increasing reports reveal the immunosuppressive role of endogenous opioids and the opioids receptors agonists that are widely used to control post-operative pain. Comparing non regenerative C57/Bl6 and regenerative MRL mice after lipectomy, we show that a transient post-operative treatment with tramadol, an opioid receptor agonist inhibits AT regeneration in MRL mice. In contrast, treatment with naloxone, an opioid receptor antagonist induces regeneration of AT in non-regenerative C57/Bl6 mice. Using Mu opioid receptor (MOR) deficient mice and hematopoietic cell transplantation, we demonstrate that MOR expressed by immune cells is required for the effects on AT regeneration. The effect of opioids is mediated by the inhibition of ROS generation that are required for AT regeneration.

For the first time in mammals, we highlight the key role of opioids and ROS in adipose tissue regeneration. This also suggests that perioperative care after injury displays large impact on adipose tissue regeneration processes.

## Introduction

Adipose tissue (AT) plays a key role in energy homeostasis as an active endocrine and metabolic organ and investigations to understand its development, homeostasis and dysfunctions are strongly stimulated by the current worldwide epidemic of obesity. Beside this involvement in energy homeostasis and associated metabolic diseases, AT raises broader concerns for reconstructive and regenerative medicine. Lipectomy (surgical removal of substantial amounts of subcutaneous fat) as well as fat transplantation are commonly used in plastic and reconstructive surgery and AT displays an emerging role as a reservoir of regenerative and therapeutic mesenchymal/stromal cells <sup>1</sup>. Whereas the molecular pathways driving adipocyte differentiation are now well investigated and described (<sup>2 3</sup> AT regenerative capability is poorly understood. In adults, regenerative capabilities after a lesion are very variable, depending on animal species and organs <sup>4</sup>. Whereas some adult inferior vertebrates such as urodele amphibians and fishes can regenerate whole amputated appendages, regeneration after intense injury in adult mammals is limited to some tissues. Among rodents, MRL mice are rare mammals that display a great regeneration capability unlike C57BL/6 mice <sup>5</sup> and genetic investigations on this species reveal a link between acute inflammation, wound healing and regeneration <sup>6</sup>. <sup>7</sup>. The importance of inflammation and its resolution on the tissue response after injury is well established. The yield and kinetic of inflammation drive the tissue response towards regeneration or wound healing and scar formation <sup>8</sup>. Recent reports in inferior vertebrates focused on the key role of reactive oxygen species (ROS) on the first steps of regenerative inflammation <sup>9, 10</sup>. In the same time, inflammation induces the release of various mediators that promote on going pain. Mainly known to modulate nociception <sup>11</sup>, endogenous opioid peptides are not only secreted by the



nervous system but also by many other cell types<sup>12, 13</sup> and opioids analgesics are the most commonly used pharmacological compounds for postoperative pain management<sup>14</sup>. They exert their activity mainly through binding to different opioid G protein-coupled receptors: mu (m), delta (d) and kappa. Their effects on wound healing are controversial and opposite effects are published. In some publications, morphine is described to improve wound healing after injury or burn of skin and Kramer and coll reported that a chronic and topically treatment with an antagonist of opioid receptors, i.e. naltrexone, seems to delay wound healing assessed by macroscopic and histological investigations<sup>15</sup>. Conversely, another study reported that the use of the same molecule naltrexone, accelerates wound healing in skin or cornea lesions in rats and humans<sup>16-18</sup> and morphine delays wound closure<sup>19 20</sup> or inhibits bone healing<sup>21</sup>. Whatever the studies, the biochemical and cell mechanisms underlining these effects are not described although several reports shed light on their putative immunosuppressive functions and their capability to modulate inflammation including ROS generation mainly via the mu-opioid receptor (MOR)<sup>22, 23</sup>.

Here we show that a pharmacological agonist of opioid receptors inhibits AT regeneration in regenerative MRL mice, whereas an antagonist of opioid receptors promotes regeneration in non-regenerative C57/Bl6 mice. These effects are mediated by MOR subtypes on immune cells via the modulation of injury induced ROS production.

## **Material and methods**

### Animals

Experiments were performed on 5- to 7-week-old male C57BL/6J mice (Harlan Laboratories), MRL/MpJ mice (CREFRE, and congenic male C57BL/6J CD45.1 mice (Charles River Laboratories) or  $\mu$ KO mice (G. Mitthieux). Animals were housed in a controlled environment (12-hour light/dark cycles at 21°C) with unrestricted access to water and a standard chow diet (UAR) in a pathogen-free animal facility (IFR150). Mice were killed by cervical dislocation. Animals were maintained in accordance to guidelines of the European Community Council. All experimental procedures were done in compliance with European regulations for animal experimentation. The authors have received requested approval from their Institutional Ethic Committee, for all the experiments performed.

### Lipectomy

One group of mice was used for the baseline control and received no surgery (Time 0; n = 20). Unilateral inguinal AT lipectomy was performed on the remaining mice (Week 3 and 6 groups). Isflurane anaesthesia supplemented with ketamine injection (50 $\mu$ l, 20 mg/ml, ip, Virbac) 50 mg/kg ip) was used for all surgeries. After the mice were shaved a single incision was made on the abdomen so that right fad pad was accessible. 35-40% of adipose fat pad was excised and the left adipose tissue was used as contralateral control. The skin was closed with 3 suture points. Sham animals were shaved, opened and right AT was dissociated from skin. Then, the skin was closed.

Regeneration of AT was assessed at various times (2 weeks, 1-2 months after lipectomy) as indicated.

#### Treatment

Mice were treated during 4 days after surgery by subcutaneous injection for naloxone methiodide (7.5mg/kg, N129, Sigma Aldrich), naloxone hydrochloride dehydrate (7.5 mg/kg, N7758, Sigma Aldrich) and Acetovanillone Apocynin 100 mg/kg (sc, 200 µl, W508454, Sigma Aldrich). Tramadol was added in the drinking water (10mg/kg, Grunenthal Belgium).

#### Regeneration quantification

To assess AT regeneration, the ratios of the AT weight ratio between lipectomied and contralateral AT were calculated, so the ratio =1 for sham mice. For the percentage of regeneration, 100% of regeneration corresponds to AT regeneration in mice treated with naloxone methiodide.

#### ROS production quantification

Mice were briefly anesthetized by isoflurane inhalation and injected with 5 mg of luminol (Sigma Aldrich) resuspended in 100 ml of PBS into the peritoneum. Animals were then imaged using an IVIS Spectrum 200 (Caliper Lifesciences) with a 2 min exposure (bioluminescence) at the indicated times after luminol injection. Image analyses were performed using LivingImage 3.0 Software. The images were calibrated with intensity color from 30 (min) to 330 (max). The background signal was defined by the photon flux on thorax and systematically retracted as follow: photons flux of lipectomied mice area minus photons flux of sham mice area.

#### Mice reconstitution with $\mu$ KO immune cells

$4 \cdot 10^3$  c-Kit<sup>+</sup>/Lin<sup>-</sup>/Sca-1<sup>+</sup> (KLS) cells sorted from the AT and  $1,6 \cdot 10^4$  cells from total bone marrow of  $\mu$ KO mice (CD45.2) were injected via the retroorbital sinus into lethally irradiated (10 Gy, Cs source<sup>137</sup>) recipient CD45.1 mice. Peripheral blood (PB) and inguinal right adipose tissue were analysed 8 weeks after transplantation by flow cytometry for CD45.1 cells quantification (level evaluation of long-term engraftment) on a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) as described previously.<sup>7</sup> Lipectomy was made 8 weeks after repopulation. Analyses were performed 2 weeks after lipectomy.

#### Isolation of AT cells

AT were carefully dissected, mechanically dissociated and digested at 37°C with collagenase (Roche Diagnostics) for 30 minutes. After elimination of undigested fragments by filtration (25  $\mu$ m), cells were collected by centrifugation at 1800 rpm for 10 minutes. The pellet, defined as the SVF were then incubated for 5 minutes in hemolysis buffer (140mM NH<sub>4</sub>Cl and 20mM Tris, pH 7.6) to eliminate red blood cells and washed by centrifugation at 1600 rpm for 6 min in PBS. Cells were counted and used for flow cytometric analysis or sorted before engraftment.

#### Flow cytometric analysis and cell sorting

Flow cytometry was used to check origin of hematopoietic cells on AT after reconstitution (CD45.1 / CD45.2 ( $\mu$ KO)). Freshly isolated SVF cells were stained in PBS containing FcR-blocking reagent. Phenotyping was performed by immunostaining with conjugated CD45.1 PeCy-7 (clone A20), CD45.2 Alexa Fluor

700 (clone 104), CD45 APC-H7 (Clone104), CD11b Pe-Cy7 (clone M1/70), Ly6G/C APC (RB6-8C5), F4/80 PerCP Cy5,5 (Clone BM8), c-Kit APC (clone 2B8) and FcεR1α PE (Clone MAR-1) and compared with isotype-matched control mAb (BD Biosciences) (Table 1). Cells were washed in PBS and analysed on a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences). Data acquisition FACSDiva Version 7 software (BD Biosciences) and analysis were performed using Kalusa Version 1.3 software (BeckmannCoulter).

### Statistical analyses

Regeneration data were analyzed using the unpaired Mann-Whitney test and *in vivo* ROS production data were analysed using ANOVA test. Data are presented as means ± SEM. Statistical significance was defined as \*  $P < .05$ , \*\*  $P < .01$ , and \*\*\*  $P < .001$ .

## **Results**

### *Opioid receptors agonist and antagonist control AT regeneration in MRL mice.*

MRL mice underwent massive lipectomy (around 45% of the whole subcutaneous fat pad was removed) and were treated during four days with tramadol, the classic post-operative analgesic and  $\mu$  opioid receptors agonist. One month after lipectomy, macroscopic analysis and weight measurement revealed that MRL injured adipose tissue (AT) had not regenerated. There was no compensatory growth of the

contralateral fat pad used as internal control (data not shown). Only a slight veil of conjunctive tissue could be observed with a small fat deposit (Fig. 1A) and the AT displayed a constant weight ratio (Fig. 1B). Same results were obtained six months after lipectomy (data not shown). Strikingly, the lack of post-operative treatment with tramadol induced the regeneration of adipose tissue in MRL mice. A large fat deposit was formed on the place of the removed AT (Fig.1A) and the AT weight ratio reached 0,8 (Fig. 1B). Conversely, post-operative treatment with an opioid receptor antagonist (naloxone methiodide) during four days after injury, largely improved the regeneration.

*Inhibition of mu-receptor opioid (MOR) induces AT regeneration in non-regenerative C57BL/6 mice*

Similarly to MRL, C57BL/6 displayed no regeneration after lipectomy in the presence of tramadol treatment. In contrast to MRL, the lack of this post-operative care was not sufficient to induce AT regeneration (data not shown) but the naloxone methiodide treatment during four days after lipectomy, significantly improved AT regeneration as soon as 2 weeks and 1 month after lipectomy (Figure 2A, 2B). The effect of naloxone that can cross the brain blood barrier (Figure S1A) was similar to those of naloxone methiodide, suggesting that only the peripheral opioid receptors inhibition mediated the observed AT regeneration. Next, we assessed the expression of PENK in AT of C57BL/6 and MRL mice (Fig S1B). PENK mRNA content was significantly higher in AT of C57BL/6 compared to MRL mice. Finally, MOR deficient mice were used to test the putative involvement of this opioid subtype receptor in post-lipectomy regenerative incapability. MOR-KO mice regenerated significantly better than C56BL/6 wild type mice 2 weeks and 1 month later after injury (Fig. 2C, 2D).

Naloxone methiodide treatment induced no supplementary effect on AT regeneration in MOR-KO mice, demonstrating that the anti-regenerative effects of opioid on AT was mediated by MOR only (Fig. 2D).

#### *ROS production is required for naloxone methiodide induced AT regeneration*

We next investigated the putative involvement of ROS production. *In vivo* imaging of ROS production after lipectomy showed that C57BL/6 mice treated with naloxone methiodide displayed a higher transient post-lipectomy ROS production compared to control C57BL/6 mice (Fig. 3A, 3B) associated with the induction of regeneration (Fig. 3C). Treatment with apocynin, an inhibitor of NADPH p47phox subunit translocation, was associated with a significant decrease of ROS production (Fig. 3B) and prevented naloxone methiodide induced regeneration in C57BL/6 mice (Fig. 3C). Similar assessment of ROS in MRL revealed a ROS increase after lipectomy (Fig. S2A) that was significantly higher than the one observed in lipectomized C57/Bl6 (Fig. S2B). This increase was strongly inhibited in Tramadol treated mice (Fig S2C). Finally, a significant inhibitory effect of apocynin on ROS production and AT regeneration was observed in tramadol non-treated MRL mice (Fig. S2D). Altogether, these results demonstrate that ROS production is required for AT regeneration in non treated MRL as well as in naloxone-treated C57/Bl6 mice and that opioids inhibit this injury-induced ROS generation.

#### *MOR on immune cells mediates naloxone methiodide regenerative effects*

We next evaluated the role of immune cells in the regenerative effects of naloxone methiodide. For that purpose we first evaluated by FACS analysis the identity of the recruited immune cells after lipectomy. Our analysis revealed that, there was a

significant increase in neutrophils after the lipectomy. This increase was specific because there was no change in macrophages and mast cells contents in AT. This specific increase was significantly higher after naloxone methiodide treatment (Fig 4A)

To demonstrate the role of immune cells in AT regeneration, we generated mice in which hematopoietic/immune cells were deprived of MOR. Briefly, lethally irradiated wild type mice expressing the CD45.1 isoform were reconstituted by cell transplantation with MOR-KO or wild type hematopoietic/immune cells, both expressing the CD45.2 isoform (Fig. 4B) as confirmed by the assessment of chimerism (Fig. S3). After lipectomy, mice that were reconstituted with MOR-KO immune cells displayed similar regeneration that mice treated with naloxone methiodide (Fig. 4B, 4C). Furthermore, the treatment of MOR-KO reconstituted mice with naloxone methiodide induced no supplementary effect (data not shown). Altogether, these results demonstrate that MOR expressed on the immune cells mediate naloxone methiodide regenerative effects on AT.



## Discussion

Taking advantage of the regenerative properties of MRL mice compared to C57/Bl6 mice, we demonstrate that endogenous opioids inhibit the induction of regeneration after a massive lipectomy. This can be overcome by the use of an opioid receptor inhibitor that allows regeneration to occur and this effect is mediated by an increase in ROS production during the first 24h after injury.

Opioids are largely used in therapeutics due to their efficient analgesia properties that are effective in perioperative period and for chronic pain management including inflammatory lesions <sup>24</sup>. Strikingly, we show that a transient and short treatment immediately after injury with an opioid receptor agonist classically used in post-operative care inhibits the regenerative properties of MRL mice adipose tissue, while similar treatment with an antagonist respectively promotes and induces regeneration in MRL and non-regenerative C57BL/6 mice. The difference in regenerative capability of C57/Bl6 and MRL mice is consistent with the lower expression of PENK in regenerative MRL mice compared to non-regenerative C57BL/6 mice and the inhibitory effect of endogenous opioids that we describe in this report. Similar decrease in beta-endorphin concentrations was previously described in hypothalamus of MRL mice <sup>25</sup>. Furthermore, the induction of regeneration in mice reconstituted with MOR deficient immune cells confirms a causal link between this opioid receptor subtype on immune cells and the regeneration processes.

The effect of opioids on AT regeneration is mediated by their effect on injury induced ROS generation. Initially described as a key event of phagocyte function and inflammation, ROS are associated with deleterious effects but a large literature emphasises the important role of these molecules as intra-cellular signalling

molecules that control numerous biological processes including apoptosis (for review, see <sup>26</sup>) and stem cell fate (ref). In our study, the key role of a NADPH oxidase dependent ROS burst in regeneration during the first 24 hours after injury is strongly supported by convergent data (i) in regenerative MRL mice, the peak of ROS is higher than the one observed in non-regenerative C57BL/6, (ii) when the regeneration is induced in this strain by opioid antagonist, ROS peak is significantly increased compared to control C57BL/6 and (iii) apocynin treatment systematically blunts the induction of regeneration in any situations. Recently, several reports highlighted the importance of ROS in regeneration events in invertebrates and inferior vertebrates, which is consistent with our findings. In *Hydra* regenerating head, ROS are produced at the wound edges within minutes upon head bisection <sup>26</sup>. In *Xenopus laevis* tadpoles and the adult zebrafish respectively, Amaya's group showed that amputation-induced increased production of ROS plays a critical role for tail regeneration and Gauron et al demonstrated that a sustained ROS production during 24 hours is a specific and essential signal for blastema formation in regeneration of tail after amputation <sup>2710</sup>.

After injury, neutrophils are the first to migrate across the vascular wall at the site of injury and generate oxidative burst <sup>28</sup>. Opioids display pleiotropic effects on many cells and are classically described as immunosuppressive molecules <sup>29</sup>. Our data reveals that opioid antagonist triggers neutrophils mobilization and is consistent with the fact that morphine decreases neutrophils infiltration after incision <sup>30</sup>.

In conclusion, our study revealed two new related mechanisms (MOR activation and injury induced ROS burst) involved in the control of adipose tissue regeneration after massive lipectomy. It is noteworthy that our study corresponds to the first

demonstration of the key role of ROS in the induction of a regeneration process in mammals; this also opens numerous questions on the effects of current post-operative care on injuries.

### **Acknowledgments**

The authors thank the US006/CREFRE INSERM/UPS (Toulouse, France) and specifically the non-invasive exploration service for giving access to the gamma-irradiator BioBeam 8000, and the zootechnical core facility for animal care, the Toulouse RIO Imaging and flow cytometry core facility (Toulouse, France) for cell sorting, X Sudre, V. Marin, A. Zakaroff-Girard, C. De Vecchi for their technical assistance. This work was supported by the EU FP7 project DIABAT (Health-F2-2011-278373), and a grant from the Midi-Pyrénées region (DESR/12052900 and DESR/14050455). E. Labit received a fellowship from the French Ministère de l'Enseignement et de la Recherche.

## Figure legends

### Figure 1: AT regeneration in MRL mice

**A.** Control intact MRL AT (Ctl), immediately (0) and 1 month (1 m) post lipectomy. **B.** Weight ratio between lipectomized and contralateral AT, 1 month after lipectomy, \* Ctl : contralateral ; Tram : Tramadol ; Nal meth : Naloxone methiodide.

### Figure 2: Induction of AT regeneration in C57BL/6 mice by inhibition of opioid receptors

**A.** C57BL/6 AT 2 weeks and 1 month after lipectomy, treated or not with Naloxone methiodide. **B.** Weight ratio between lipectomized and contralateral AT, 2 weeks and 1 month after lipectomy and treatment or not with Naloxone methiodide. **C.** C57BL/6 mice (WT) and MOR KO mice AT 2 weeks post lipectomy and treatment or not with Naloxone methiodide. **D.** Weight ratio between lipectomized and contralateral AT 2 weeks post lipectomy in C57BL/6 mice (WT) and MOR KO mice treated or not with Naloxone methiodide. Ctl : contralateral ; Nal meth : Naloxone methiodide.

### Figure 3: AT regeneration requires ROS production in C57BL/6 mice

**A.** *In vivo* detection of ROS production at 3, 6 and 12 hours after lipectomy and treatment or not with Naloxone methiodide. **B.** *In vivo* quantification of ROS production at 0, 3, 6, 12 24, 48 and 72 hours after lipectomy and treatment or not with Naloxone methiodide (n=8) and apocynin, an inhibitor of ROS production (n=6). \*\* : significant differences between Lip + Nal Meth mice and Lip + Nal Meth + Apocynin mice; # : significant difference between Lip mice and Lip + Nal Meth mice. **C.** AT 1 month after lipectomy and treatment or not with Naloxone methiodide and

apocynin (left). Quantification of AT regeneration (right) Nal meth : Naloxone methiodide

Figure 4 : Mu opioid receptors on immune cells mediate Naloxone-induced AT regeneration

**A.** Flow cytometry analysis of AT immune cells 1 hour and 6 hours post lipectomy. **B.** Model of mice repopulation. **C.** AT of C57BL/6 (WT) and C57BL/6 mice reconstituted with MOR KO immune cells (repopulated mice) 2 weeks after lipectomy (left). Quantification of AT regeneration 2 weeks after lipectomy, in C57BL/6 mice (WT) (n=14), MOR KO mice (n=6) and in reconstituted mice with MOR KO immune cells (repopulated mice) (n=12), treated or not with Naloxone methiodide (right). Nal meth : Naloxone methiodide.

**Supplementary figures**

Figure S1 : **A.** Weight ratio between lipectomied and contralateral AT, 1 month after lipectomy and treatment with Naloxone Methiodide (Nal Meth) or Nal (Naloxone). **B.** Penk expression in adipose tissue from MRL mice and C57BL/6 (n=6)

Figure S2 : **A.** *In vivo* detection of ROS production at 3, 6 and 12 hours in Sham and lipectomied MRL mice. **B.** *In vivo* quantification of ROS production at 0, 3, 6, 12 24, 48 and 72 hours after lipectomy in C57BL/6 and MRL mice. **C.** *In vivo* quantification of ROS production at 0, 3, 6, 12 24, 48 and 72 hours after lipectomy in MRL mice treated or not with Tramadol (n=8). **D.** AT 2 weeks after lipectomy in MRL mice treated or not with apocynin (left). Weight ratio between lipectomied and contralateral AT (right).

Figure S3 : FACS analysis of repopulated wild type mice (CD45.1) with MUKO immune cells (CD45.2).

## References:

1. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 2007; **100**(9): 1249-60.
2. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell* 2014; **156**(1-2): 20-44.
3. Peirce V, Carobbio S, Vidal-Puig A. The different shades of fat. *Nature* 2014; **510**(7503): 76-83.
4. Brockes JP, Kumar A. Comparative aspects of animal regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008; **24**: 525-49.
5. Gourevitch DL, Clark L, Bedelbaeva K, Leferovich J, Heber-Katz E. Dynamic changes after murine digit amputation: the MRL mouse digit shows waves of tissue remodeling, growth, and apoptosis. *Wound Repair Regen* 2009; **17**(3): 447-55.
6. De Franco M, Carneiro Pdos S, Peters LC, Vorraro F, Borrego A, Ribeiro OG *et al.* Slc11a1 (Nramp1) alleles interact with acute inflammation loci to modulate wound-healing traits in mice. *Mamm Genome* 2007; **18**(4): 263-9.
7. Zhang Y, Strehin I, Bedelbaeva K, Gourevitch D, Clark L, Leferovich J *et al.* Drug-induced regeneration in adult mice. *Sci Transl Med* 2015; **7**(290): 290ra92.
8. Aurora AB, Olson EN. Immune modulation of stem cells and regeneration. *Cell Stem Cell* 2014; **15**(1): 14-25.
9. Niethammer P, Grabher C, Look AT, Mitchison TJ. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* 2009; **459**(7249): 996-9.
10. Gauron C, Rampon C, Bouzaffour M, Ipendey E, Teillon J, Volovitch M *et al.* Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed. *Scientific reports* 2013; **3**: 2084.
11. Fields H. State-dependent opioid control of pain. *Nature reviews. Neuroscience* 2004; **5**(7): 565-75.
12. Stefano GB, Scharrer B, Smith EM, Hughes TK, Jr., Magazine HI, Bilfinger TV *et al.* Opioid and opiate immunoregulatory processes. *Crit Rev Immunol* 1996; **16**(2): 109-44.

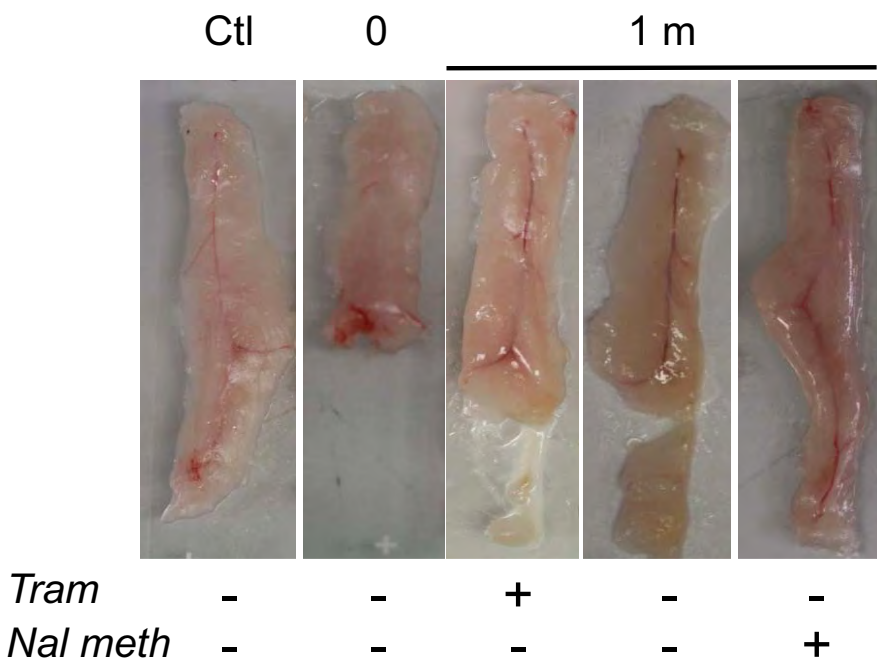
13. Nelson CJ, Schneider GM, Lysle DT. Involvement of central mu- but not delta- or kappa-opioid receptors in immunomodulation. *Brain, behavior, and immunity* 2000; **14**(3): 170-184.
14. Austrup ML, Korean G. Analgesic agents for the postoperative period. Opioids. *The Surgical clinics of North America* 1999; **79**(2): 253-73.
15. Kramer MH, Mangram AJ, Pearson ML, Jarvis WR. Surgical-site complications associated with a morphine nerve paste used for postoperative pain control after laminectomy. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; **20**(3): 183-6.
16. Immonen JA, Zagon IS, Lewis GS, McLaughlin PJ. Topical treatment with the opioid antagonist naltrexone accelerates the remodeling phase of full-thickness wound healing in type 1 diabetic rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2013; **238**(10): 1127-35.
17. McLaughlin PJ, Pothering CA, Immonen JA, Zagon IS. Topical treatment with the opioid antagonist naltrexone facilitates closure of full-thickness wounds in diabetic rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2011; **236**(10): 1122-32.
18. Reece AS. Chronic ulcers caused by injection of substances: healing aided by naltrexone. *Arch Dermatol* 2009; **145**(4): 375-7.
19. Rook JM, Hasan W, McCarson KE. Morphine-induced early delays in wound closure: involvement of sensory neuropeptides and modification of neurokinin receptor expression. *Biochem Pharmacol* 2009; **77**(11): 1747-55.
20. Martin JL, Koodie L, Krishnan AG, Charboneau R, Barke RA, Roy S. Chronic morphine administration delays wound healing by inhibiting immune cell recruitment to the wound site. *The American journal of pathology* 2010; **176**(2): 786-799.
21. Chrastil J, Sampson C, Jones KB, Higgins TF. Postoperative opioid administration inhibits bone healing in an animal model. *Clin Orthop Relat Res* 2013; **471**(12): 4076-81.
22. Roy S, Barke RA, Loh HH. MU-opioid receptor-knockout mice: role of mu-opioid receptor in morphine mediated immune functions. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; **61**(1-2): 190-4.
23. Ninkovic J, Roy S. Role of the mu-opioid receptor in opioid modulation of immune function. *Amino Acids* 2013; **45**(1): 9-24.
24. Gautam S, Franzini L, Mikhail OI, Chan W, Turner BJ. Novel Measure of Opioid Dose and Costs of Care for Diabetes Mellitus: Opioid Dose and Health Care Costs. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 2016; **17**(3): 319-327.



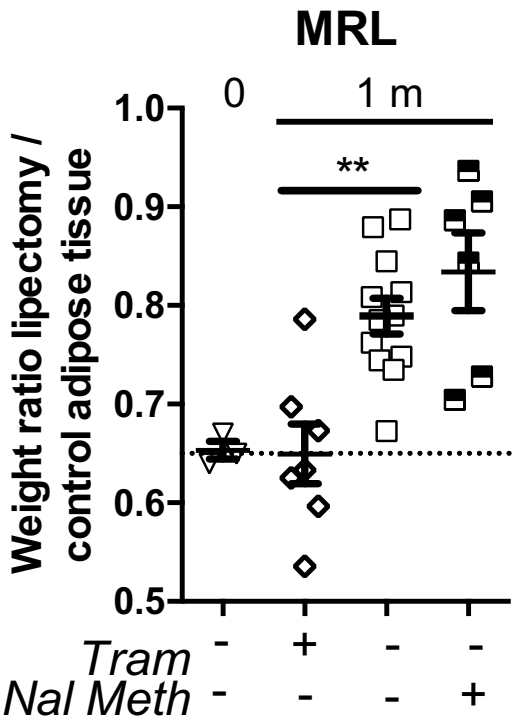
25. Sacerdote P, Lechner O, Sidman C, Wick G, Panerai AE. Hypothalamic beta-endorphin concentrations are decreased in animal models of autoimmune disease. *Ann N Y Acad Sci* 1999; **876**(1): 305-8.
26. Vríz S, Reiter S, Galliot B. Cell death: a program to regenerate. *Curr Top Dev Biol* 2014; **108**: 121-51.
27. Love NR, Chen Y, Ishibashi S, Kritsiligkou P, Lea R, Koh Y *et al*. Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Nature cell biology* 2013; **15**(2): 222-228.
28. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal* 2014; **20**(7): 1126-67.
29. Stein C. The control of pain in peripheral tissue by opioids. *The New England journal of medicine* 1995; **332**(25): 1685-1690.
30. Clark JD, Shi X, Li X, Qiao Y, Liang D, Angst MS *et al*. Morphine reduces local cytokine expression and neutrophil infiltration after incision. *Molecular pain* 2007; **3**: 28.

**Figure 1:**

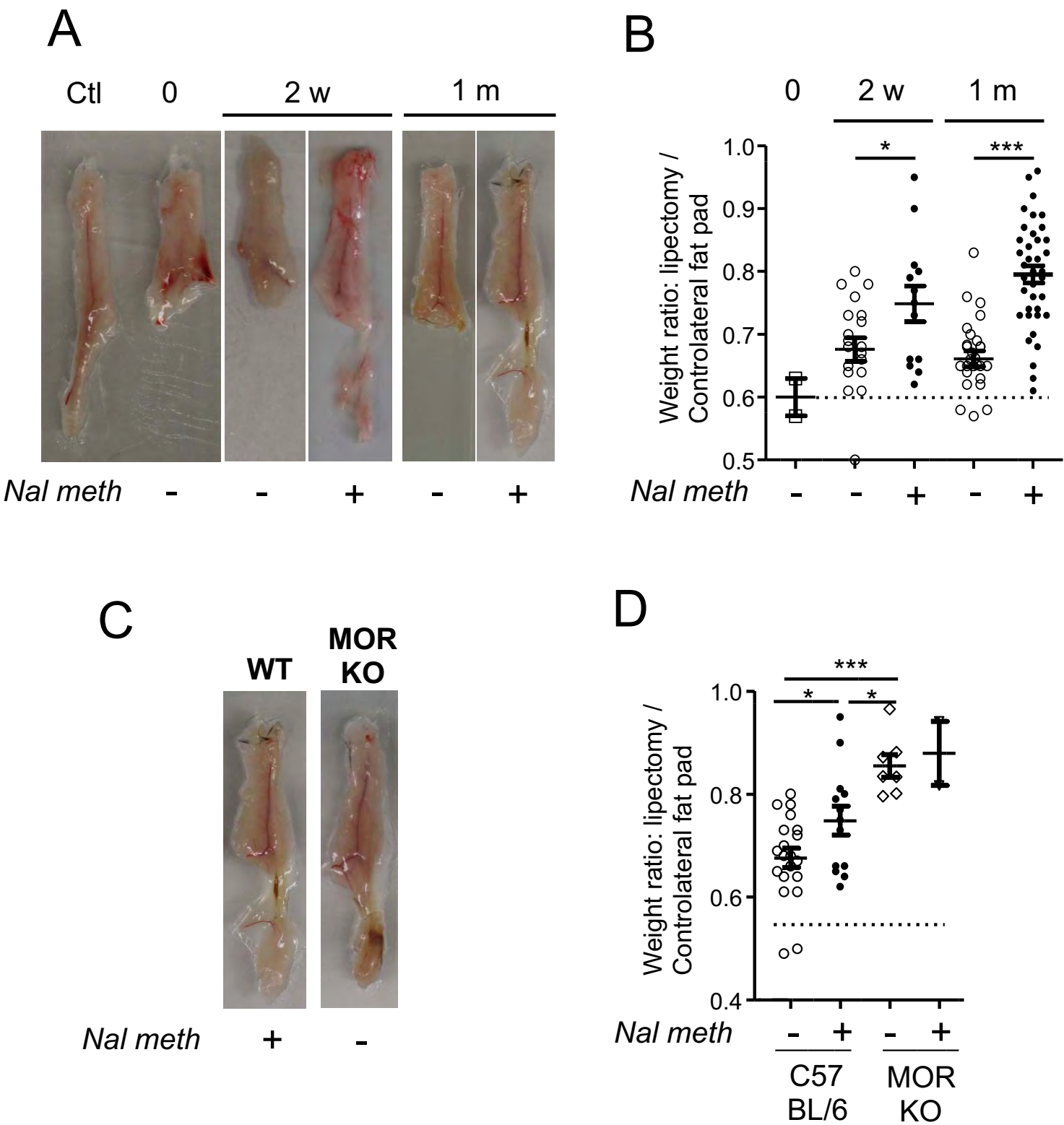
**A**



**B**



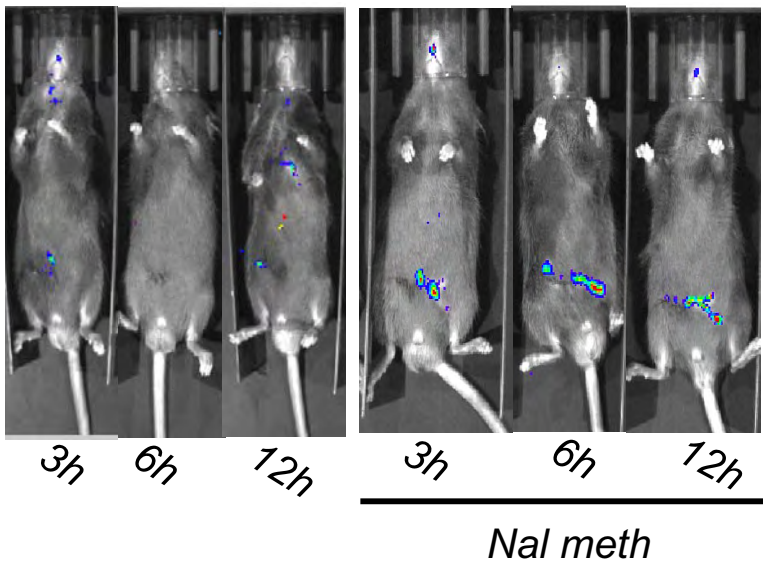
**Figure 2:**



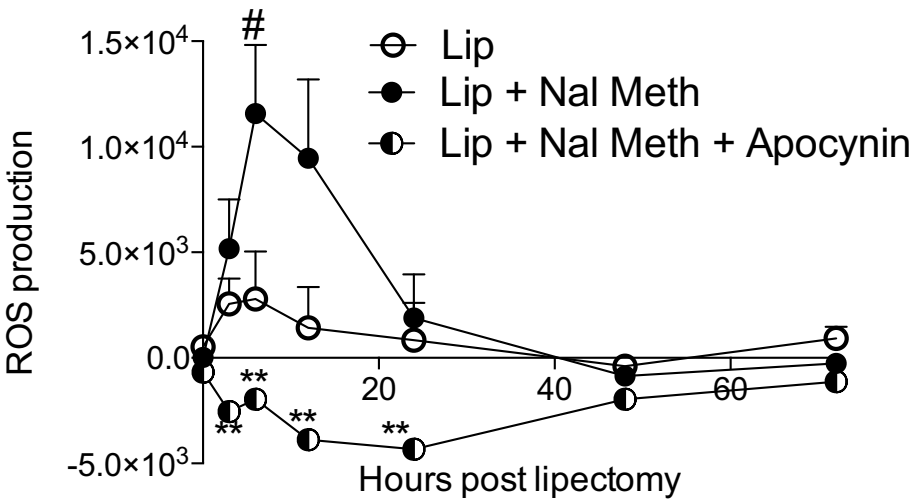
**Figure 3:**

**C57/Bl6**

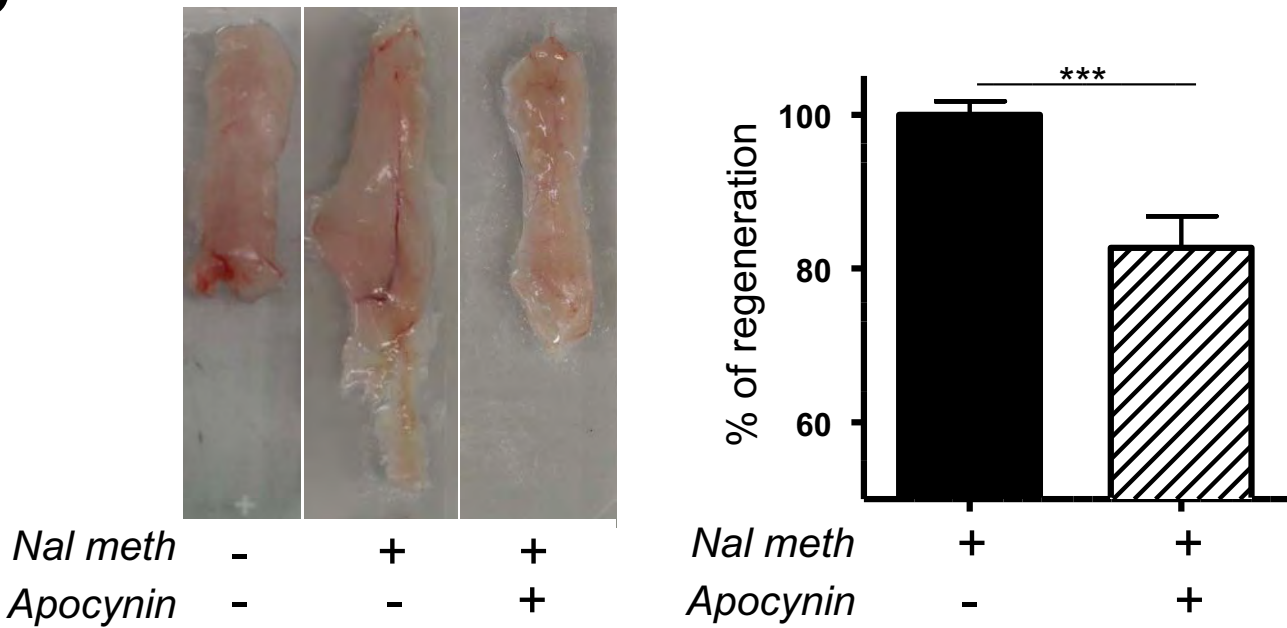
**A**



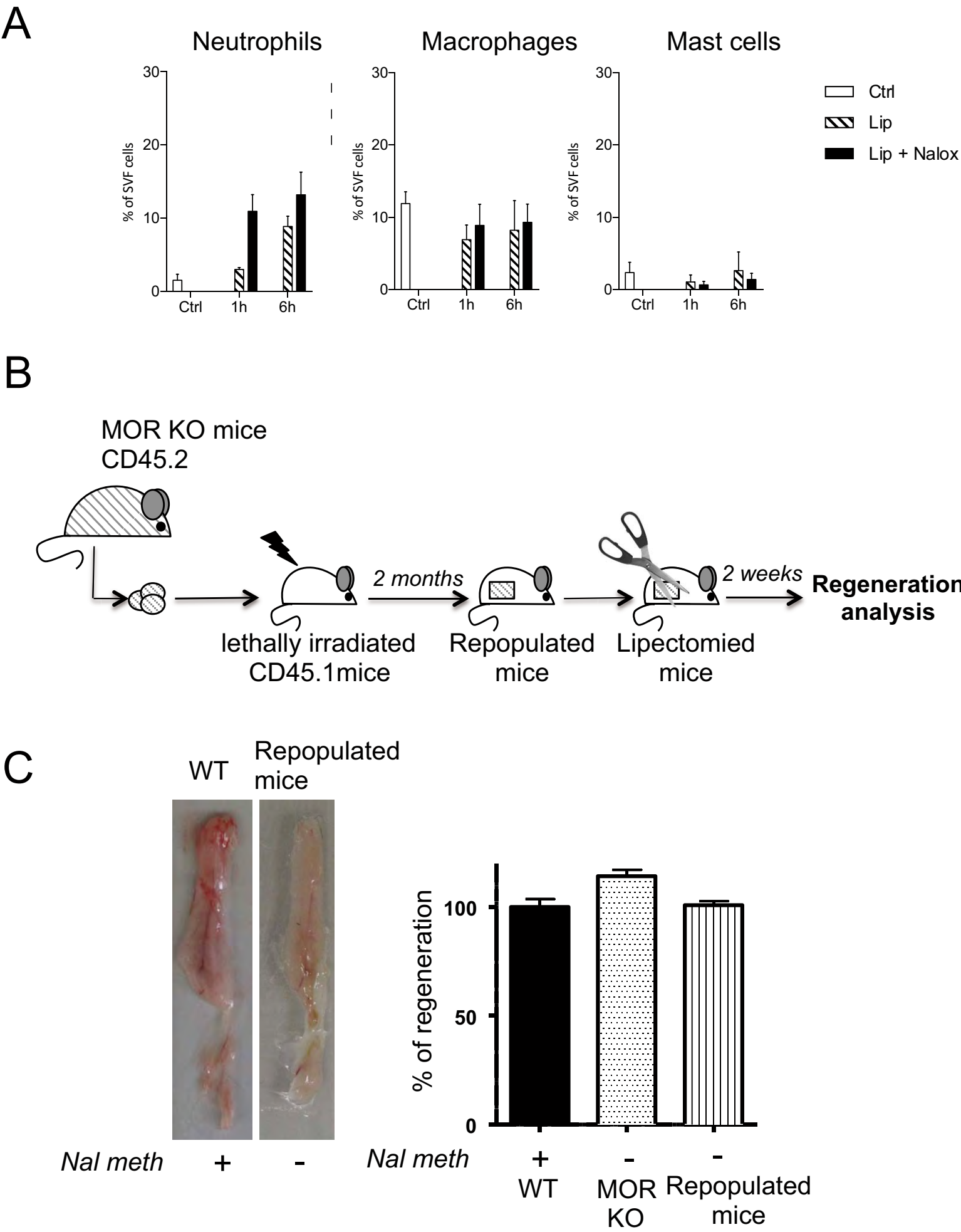
**B**



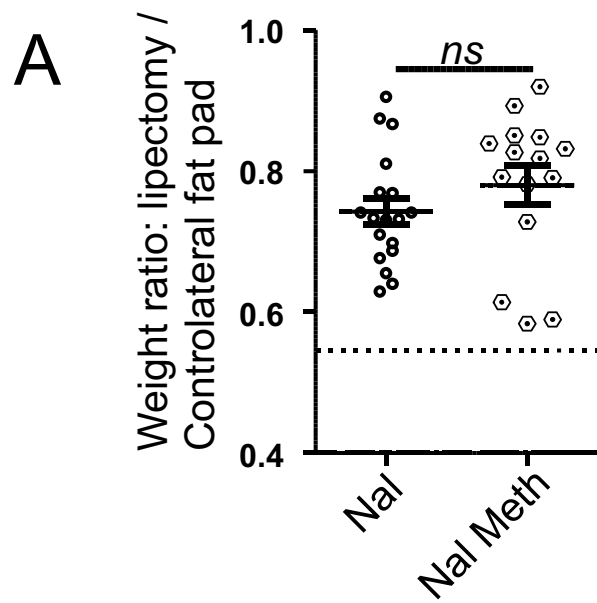
**C**



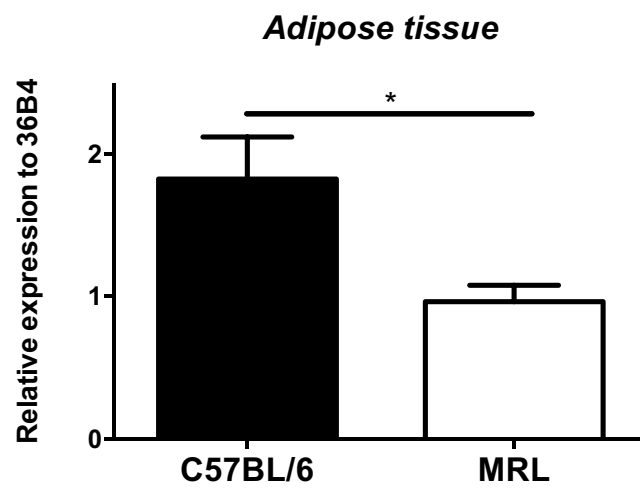
**Figure 4:**



**Figure S1:**

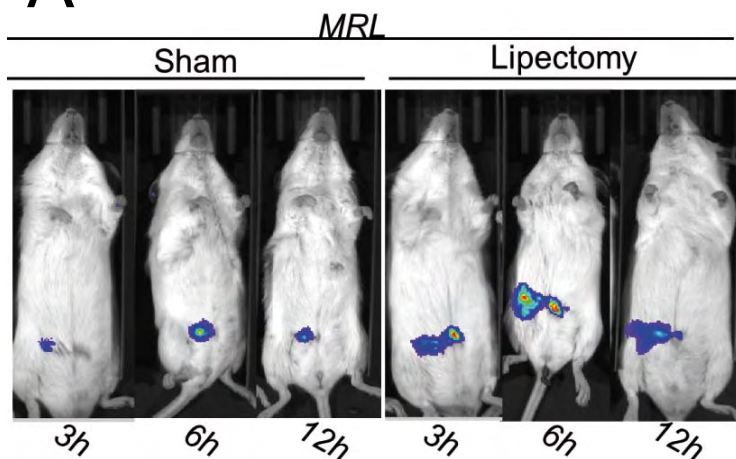


**B**

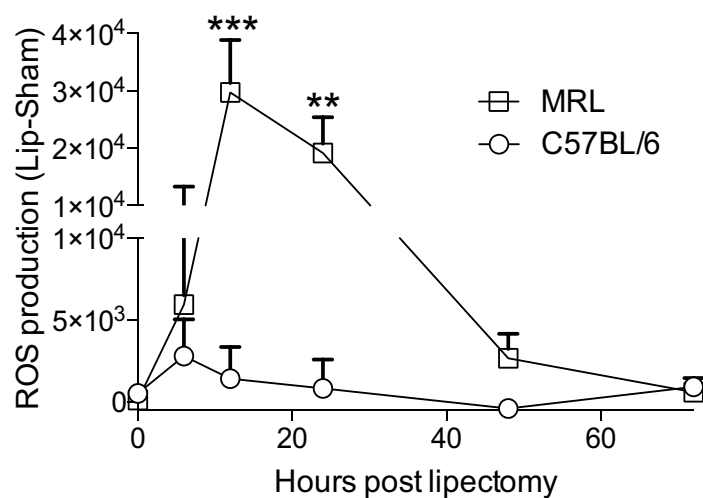


**Figure S2:**

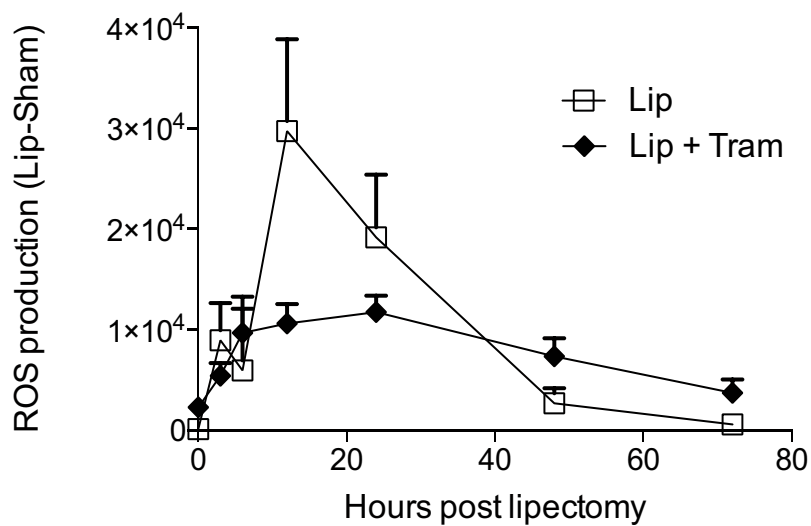
**A**



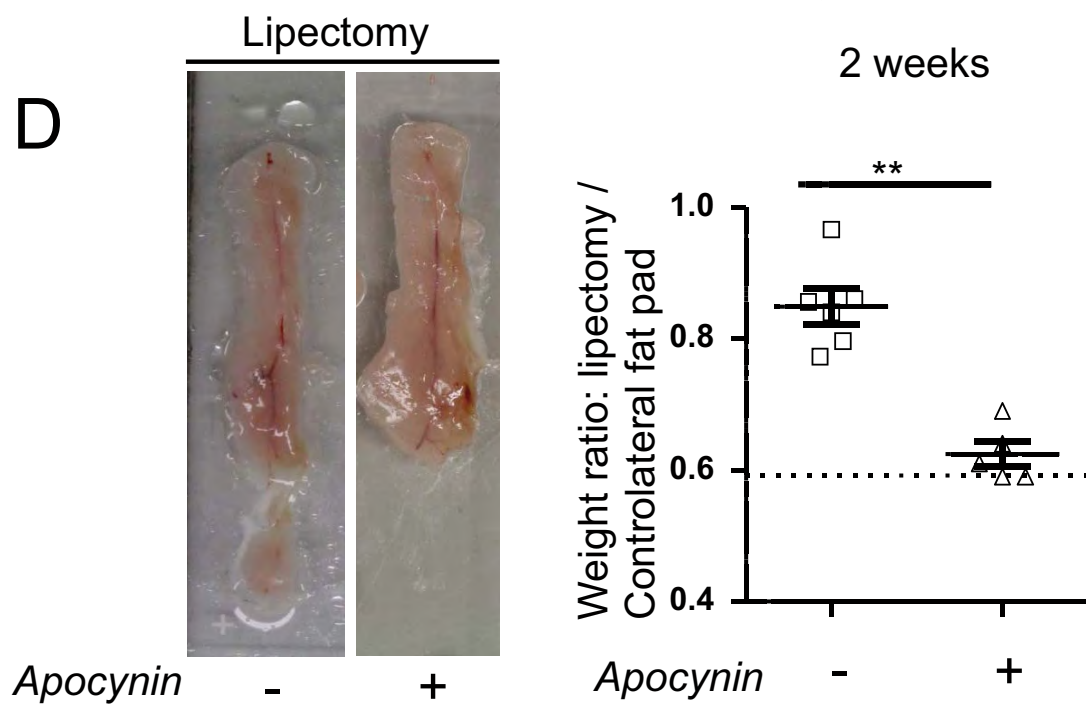
**B**



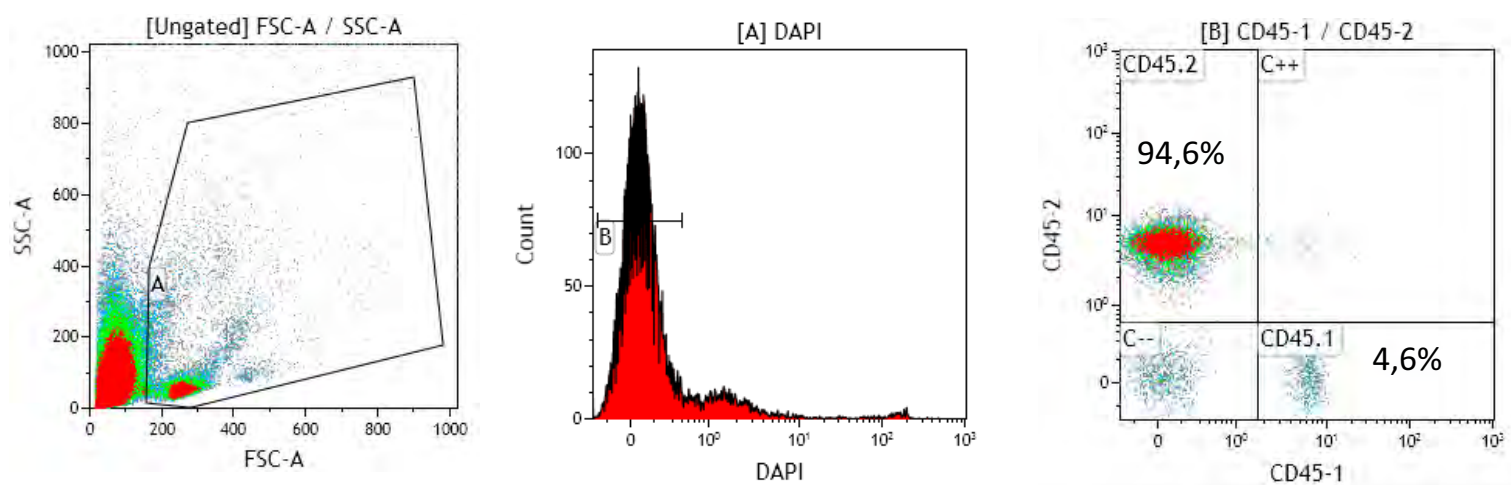
**C**



**D**



**Figure S3:**





### III. Résultats complémentaires

Dans l'article en cours de finalisation, nous montrons que :

- Le TA de souris MRL régénère. Chez la souris MRL, l'activation des récepteurs  $\mu$  avec un agoniste (le tramadol) inhibe la régénération du TA
- Au contraire, chez la souris C57Bl/6, l'inhibition des récepteurs  $\mu$  avec un antagoniste (la nalaxone méthiodide) stimule la régénération. L'effet pro-régénérant du traitement passe par les récepteurs  $\mu$  présents sur les cellules immunitaires.
- La régénération du TA chez la souris MRL, comme chez la souris C57Bl/6 traitée avec l'antagoniste des récepteurs  $\mu$  est dépendante d'une production d'EAOs, 12h après la lipectomie.

Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une différence de production d'opioïdes endogènes existait entre les deux lignées de souris.

#### A. Régénération et opioïdes

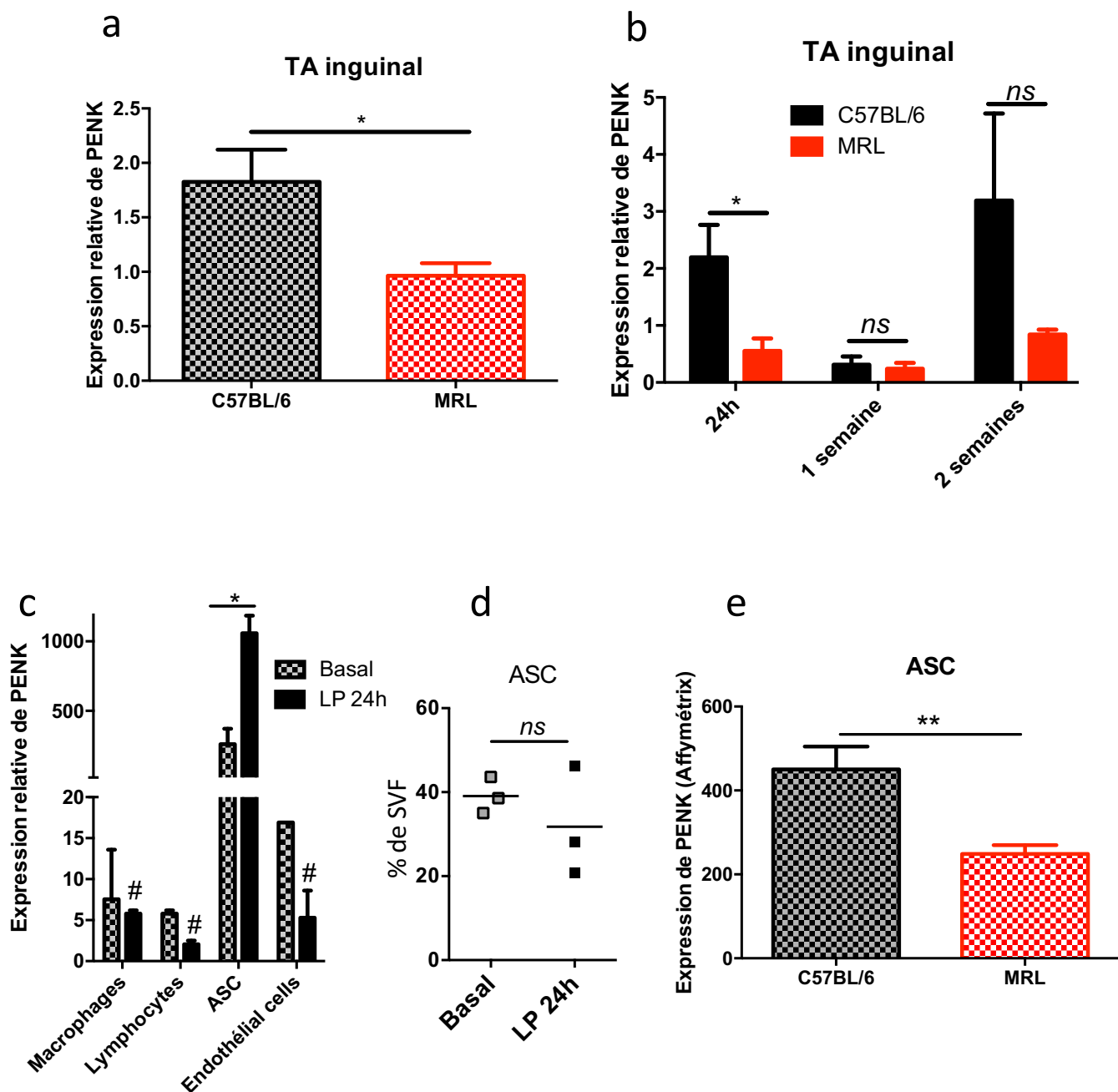
##### 1. Niveau d'expression des opioïdes endogènes au niveau tissulaire

Dans un premier temps, nous avons recherché si le niveau d'expression d'un ou plusieurs opioïdes endogènes, dans le TA inguinal, en condition basale, était différent entre les souris C57Bl/6 et les souris MRL, d'autant plus que Sacerdote et coll. ont montré en 1999, que les souris MRL avaient une concentration hypothalamique en opioïdes endogènes moins importante que les souris ne présentant pas de lupus érythémateux<sup>362</sup>.

##### a) Expression génique basale d'opioïdes endogènes chez les souris C57BL/6 et MRL

Aucune expression génique de la prodynorphine et pro-opiomélanocortine n'a été retrouvée dans le TA inguinal, chez les souris C57BL/6 comme chez les souris MRL (donnée non montrée).

Concernant l'expression de la proenképhaline (PENK), nos résultats révèlent un niveau d'expression deux fois moins important chez la souris MRL que chez la souris C57BL/6 ( $1,8 \pm 0,2$  pour les C57Bl/6 vs  $0,96 \pm 0,11$ ) (*Fig. 62a*). Des résultats



**Figure 62 : Expression de PENK en condition basale ou après la lipectomie dans les ASCs et TA**

a) Expression basale de PENK dans le TA inguinal de souris C57BL/6 (noir) et MRL (rouge). L'expression est normalisée à celle de 36B4, (n=6 par groupe).

Test statistique : t-test : \* $p < 0,05$

b) Expression de PENK dans le TA inguinal de souris C57BL/6 (noir) et MRL (rouge), 24h , 1 et 2 semaines après lipectomie.

Test statistique : ANOVA : \* :  $p < 0,05$ , NS : Non Significatif

c) Expression de PENK dans différentes populations cellulaires de la SVF triées à l'état basal (hachuré) ou 24h post lipectomie (noir) chez la souris C57BL/6.

Test statistique : ANOVA : # :  $p < 0,05$  entre ASC LP 24h et autres cellules LP 24h, \* $p < 0,05$  entre ASC basale et ASC LP 24h

d) Pourcentage d'ASCs en condition basale (gris) et 24h après la lipectomie (noir), chez les souris C57BL/6

e) Expression basale de PENK (données affymétrie) dans les ASCs natives triées à partir de TA de C57BL/6 et de MRL (n=4 tris)

Test statistique : t-test: \*\* $p < 0,01$

identiques ont aussi été trouvés dans la moelle épinière (données non montrées) en cohérence avec la littérature<sup>362</sup>.

b) Expression génique d'opioïdes endogènes chez les souris C57BL/6 et MRL, après lipectomie

Vingt-quatre heures après lipectomie, on note que le niveau d'expression de PENK est 4 fois plus important chez la C57BL/6 ( $2,2 \pm 0,5$ ) que chez la MRL ( $0,5 \pm 0,15$ ) (*Fig. 62b*). Cependant, une et deux semaines après la lipectomie, il n'y a plus de différence significative entre les 2 lignées de souris.

2. *Quelle(s) population(s) cellulaire(s) du TA exprime(nt) PENK ?*

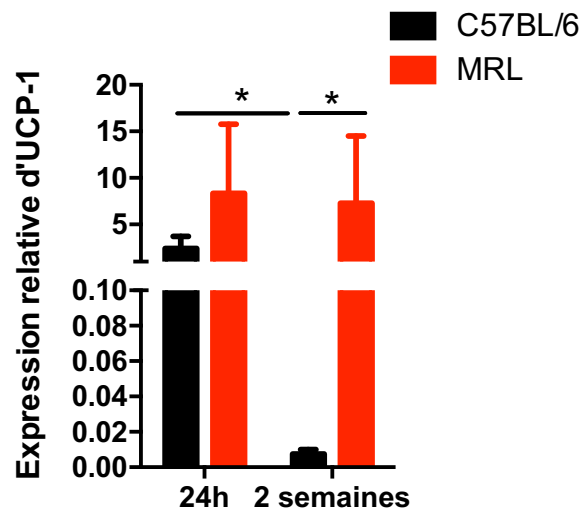
Il est admis dans la littérature que les cellules immunitaires produisent des opioïdes, nous nous sommes demandé ce qu'il en était dans le TA.

Chez la souris C57BL/6, après tri des différentes populations cellulaires qui constituent la SVF, on observe qu'en condition basale (barre noire et grise), les cellules du TA qui expriment le plus PENK sont les ASCs (*Figure 62c*). Les macrophages et lymphocytes l'expriment également mais à des niveaux bien plus faibles.

Vingt-quatre heures après la lipectomie du TA, seules les ASCs ont un niveau d'expression de PENK augmenté de manière significative ( $1157 \pm 127$ ) par rapport au niveau d'expression par ces mêmes cellules avant la lipectomie ( $260 \pm 107$ ) (*Fig. 62c*). Il est important de souligner que 24h après la lipectomie, le pourcentage d'ASCs n'augmente pas (*Fig. 62d*). La stabilité de l'expression de PENK dans les autres cellules étudiées (macrophages, lymphocytes, cellules endothéliales) après lipectomie (*Fig. 62c*) est à corrélérer avec la stabilité du pourcentage de ces cellules dans la SVF, 24h après lipectomie (*Fig. 62b*).

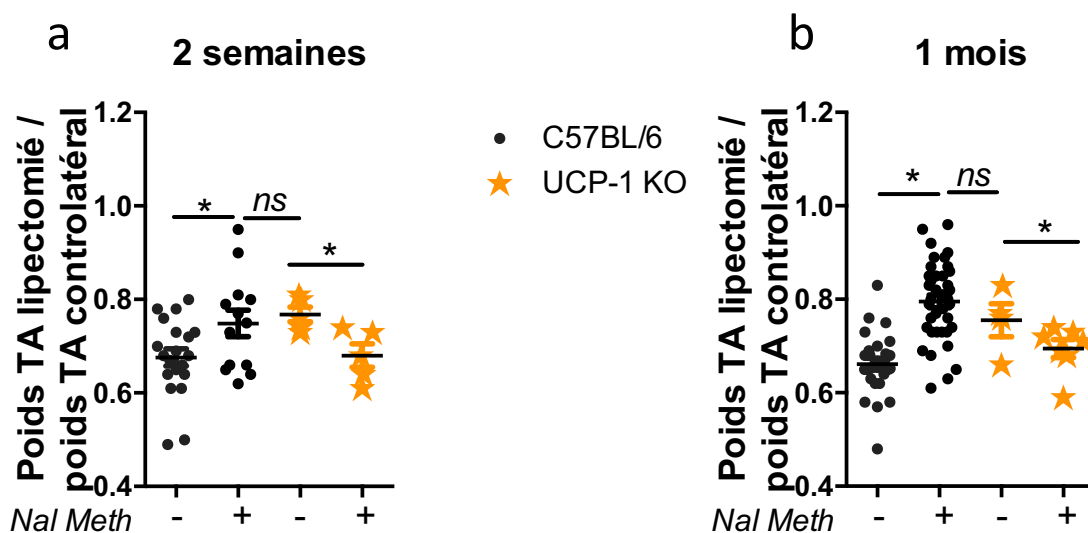
Par manque de souris MRL mâles de 5 semaines disponibles au sein de notre élevage, nous n'avons pu évaluer l'expression de PENK dans toutes ces populations cellulaires 24h après lipectomie. Cependant, nous avons pu étudier les différences en conditions basales pour des ASCs triées natives issues de souris C57BL/6 et MRL.

Après avoir trié par cytométrie en flux des ASCs de TA inguinal de C57BL/6 et de MRL, nous avons analysé les différences d'expression entre ces deux souches de souris, grâce à la technologie Affymetrix. Les résultats obtenus révèlent que les



**Figure 63 : Diminution de l'expression génique d'Ucp1, 2 semaines après la lipectomie chez les souris C57BL/6 (n=4).**

Test statistique : ANOVA : \* $p < 0,05$ ,



**Figure 64 : Les souris Ucp1 KO régénèrent aussi bien que les souris C57BL/6 sauvages traitées à la naloxone méthiodide (Nal Meth), (a) 2 semaines après lipectomie et (b) 1 mois après lipectomie**

Test statistique : ANOVA : NS : Non significatif \* $p < 0,05$

ASCs de C57BL/6 diffèrent de celles des MRL en terme d'expression génique puisque 122 gènes sont spécifiquement exprimés chez les ASCs de MRL. Ces gènes sont impliqués dans la réponse inflammatoire, les pathologies infectieuses, les processus de transcription / traduction et le métabolisme énergétique. Une des plus importantes différences concerne l'expression du gène PENK. En effet, on observe que l'expression de ce gène est plus importante dans les ASCs de C57BL/6 que dans celles de MRL ( $450 \pm 54$  contre  $248 \pm 21$ ) (*Fig. 62e*).

## **B. Ucp1 et régénération**

Au cours des observations des TA lipectomiés des souris MRL en immunofluorescence, 2 semaines après lipectomie, les adipocytes présents sur le front de lésion semblent être multiloculaires, pouvant faire penser à des adipocytes beiges. Nous n'avons pas fait d'immunofluorescence anti-Ucp1 mais nous avons montré, par RT-qPCR, que deux semaines après lipectomie, l'expression génique d'Ucp1 est fortement diminuée dans le TA de souris C57BL/6 alors qu'elle reste inchangée chez les souris MRL (*Fig. 63*).

Afin de savoir si l'expression conséquente d'Ucp1 était nécessaire à la régénération du TA, nous avons procédé à une lipectomie chez des souris invalidées pour Ucp1 (souris Ucp1-KO).

A notre grande surprise, on observe que la souris Ucp1-KO régénère aussi bien que la souris C57BL/6 traitée à la naloxone (rapport poids TA lipectomé / poids TA controlatéral =  $0,78 \pm 0,016$  chez la souris Ucp1-KO, vs  $0,75 \pm 0,03$  chez la C57BL/6 traitée à la naloxone méthiodide), 2 semaines et 1 mois après la lipectomie (*Fig. 64a et 64b*). En revanche, le traitement, après lésion, avec la naloxone méthiodide diminue la régénération chez les souris Ucp1-KO (*Fig. 64a et b*).

*On peut donc conclure qu'Ucp1 pourrait être un frein à la régénération puisque les souris Ucp1-KO régénèrent aussi bien que les souris C57BL/6 traitées à la naloxone méthiodide. Ces données ne sont, néanmoins, pas cohérentes avec les données d'expression génique d'Ucp1 chez les souris MRL.*



### **III. Discussion**

Brièvement et de manière très simplifiée, nos données montrent que les souris C57BL/6, ne régénèrent pas leur TA alors que les souris MRL et les C57BL/6 traitées par un antagonistes aux récepteurs des opioïdes le font.

#### **A. Fibrose, inflammation et régénération**

Nos résultats montrent qu'après lipectomie massive au niveau de l'aîne, le TA de souris C57BL/6 ne régénère pas mais « cicatrise » puisqu'il ne récupère pas son poids avant lipectomie et qu'il présente une fibrose.

Nous avons vu que les deux souches de souris étudiées, C57BL/6 et MRL présentaient des différences significatives en terme de fibrose et d'expression génique de cytokines inflammatoires.

En effet, nos résultats mettent en évidence qu'après lésion, le TA de souris C57BL/6 présente, 2 mois après lipectomie, d'importants dépôts de MEC, à la différence des souris MRL, et que cette « fibrose » est associée à une colonisation de cellules doublement positives pour le CD45 et CD34, faisant penser à des fibrocytes. Comme décrit dans l'introduction, l'inflammation et la fibrose sont deux mécanismes intimement liés : la durée et l'intensité de la réponse pro-inflammatoire induiront, ou pas, l'activation des fibrocytes et/ou des myofibroblastes. Cette activation a pour conséquence une synthèse excessive de MEC et entraîne la mise en place d'une fibrose<sup>133,135,134</sup>.

Concernant la réponse inflammatoire, nos données montrent que cette réponse est différente entre les souris C57BL/6 et MRL: les souris MRL présentent, 24h après lésion, une augmentation du niveau d'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- $\alpha$ . Cependant, nos données n'ont pas permis de caractériser la cinétique précise d'une phase pro-inflammatoire et d'une phase anti-inflammatoire, puisque l'expression de gènes des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-13, IL-10, ...) n'a pas révélé de différences entre les deux souches de souris 24h, 1 semaine et 2 semaines après la lipectomie. De plus, il est évident que nous devons étendre notre investigation à la sécrétion de ces cytokines, en plus de leur niveau d'expression, au sein du TA après lésion. Par ailleurs, nous avons aussi évalué le





pourcentage des différentes populations de cellules immunitaires aux temps 24h, 1 semaine et 2 semaines car dans la cicatrisation de la peau, Gurtner et coll. décrivent ces temps comme clés (*cf Introduction, chapitre II, I*)<sup>124</sup>. Seule une augmentation du niveau d'expression du CD45 a pu être détectée 24h après la lipectomie chez la souris MRL, suggérant la présence d'un plus grand nombre de cellules immunitaires sur le site de la lésion. Néanmoins, ceci n'a pas pu être validé en cytométrie en flux. Etant donné que le recrutement de cellules immunitaires sur la zone de lésion est plus précoce chez les vertébrés inférieurs (qui régénèrent) que chez les mammifères adultes (qui cicatrisent), il serait judicieux, d'analyser la répartition des différentes populations de cellules immunitaires du TA, ainsi que le profil pro- et anti-inflammatoires à des temps plus courts et rapprochés (1h-2h-6h-48h-72h après la lipectomie). Je pense qu'ainsi, nous mettrions en évidence d'avantage de différences entre les souris C57BL/6 et MRL.

Cette analyse à des temps précoces après la lipectomie, est d'autant plus nécessaire que nous avons montré que la production d'EAOs était augmentée à des temps courts après lésion : 12h pour les souris MRL et 6h pour les souris C57BL/6 traitées à la naloxone. Nos données sont en adéquation avec la littérature qui révèle un burst oxydatif entre 1h et 12h après lésion, respectivement chez l'hydre et le poisson zèbre, même si une comparaison des cinétiques entre différentes espèces reste toujours délicate<sup>363</sup>. Cette production accrue d'EAOs est à corréluer avec la présence d'un plus grand nombre de neutrophiles chez les souris C57BL/6 traitées à la naloxone en comparaison aux souris C57BL/6 non traitées. Nous n'avons malheureusement pas pu encore évaluer le nombre de neutrophiles chez la souris MRL à ces mêmes temps précoces.

Enfin, des données très préliminaires nous confortent dans cette différence de réponse inflammatoire puisqu'en collaboration avec le Dr. B. Pipy, nous montrons que le TA de souris MRL présente des concentrations de leucotriène B4 (LTB4) plus importantes que dans le TA de souris C57BL/6, 4h après la lipectomie. Le LTB4 est un médiateur lipidique pro-inflammatoire permettant la vasodilatation des vaisseaux mais également le recrutement de neutrophiles après une lésion ou infection<sup>364</sup>. Il serait alors aujourd'hui intéressant de quantifier les neutrophiles chez les souris MRL et de doser le LTB4 chez les souris C57BL/6 traitées à la naloxone. Ainsi, la plus forte concentration en médiateurs lipidiques du TA aux temps courts après lipectomie entre les souris qui régénèrent et celles qui ne régénèrent pas serait cohérente avec



l'augmentation du nombre de neutrophiles observée chez les souris C57BL/6 traitées à la naloxone, cette augmentation étant elle-même cohérente avec la forte production d'EAOs mesurée *in vivo*. De plus, ces données corroboreraient avec celles de Zhang et coll. qui montrent que l'inhibition de la dégradation du médiateur lipidique PGE2 (prostaglandine pro-inflammatoire <sup>365</sup>) favorise la régénération dans deux modèles : la colite intestinale et l'ablation partielle du foie, chez la souris <sup>366</sup>. Les auteurs expliquent que l'effet positif de la PGE2 sur la régénération passe par une augmentation du nombre de neutrophiles et de cellules souches sur les sites de lésion <sup>366</sup>.

Ainsi, au regard des données de la littérature et de la mise en perspective de nos données il ressort que 24h après lésion chez les souris MRL ou chez les souris C57BL/6 traitées à la naloxone, i) le pic d'EAOs est revenu à un niveau basal, ii) le nombre de granulocytes neutrophiles est identique à des souris qui ne régénèrent pas, iii) la quantité de médiateurs lipidiques (LTB4) est revenu à un état basal. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que pour que la régénération ait lieu, la phase inflammatoire doit être intense mais brève (moins de 24h). On peut donc imaginer qu'une phase inflammatoire trop peu intense ou trop tardive chez les souris C57BL/6 serait responsable de l'absence d'une régénération au profit d'une cicatrisation. Pour valider ces hypothèses, on pourrait alors augmenter l'intensité de la phase pro-inflammatoire ou la décaler dans le temps (l'avancer) chez les souris C57BL/6 pour activer la régénération. Pour cela, on pourrait envisager i) d'injecter localement du G-CSF (Granulocytes colonizing Factor, qui est un chémo-attractant pour les neutrophiles) après lésion, ou ii) d'augmenter l'activité de la NADPH oxydase afin d'augmenter la production d'EAOs 6h après lésion grâce au TPA, par exemple. On pourrait ainsi espérer orienter la réparation tissulaire vde la C57BL/6 vers une régénération.

*Parallèlement à ces résultats et réflexions sur l'inflammation, nos résultats ont permis de révéler que les antagonistes des récepteurs aux opioïdes stimulaient la régénération <sup>351</sup>.*



## **B. Deux types de réparation tissulaire (cicatrisation / régénération) associés à deux tonus d'opioïdes endogènes**

Nos données mettent en évidence que i) l'expression de PENK est plus forte, en condition basale, chez les souris C57BL/6 que chez les souris MRL, ii) la lipectomie n'entraîne pas d'augmentation significative de l'expression de PENK dans le TA à 24h alors qu'une augmentation significative de l'expression génique de PENK, uniquement par les ASCs peut être observée, 24h après lipectomie.

L'une des grandes différences entre les souris C57BL/6 et MRL est le niveau d'expression de PENK dans le TA, en condition basale puisque les souris C57BL/6 expriment 4 fois plus PENK que les souris MRL. Même si il est nécessaire de doser les enképhalines par dosage Elisa, ces données sont cohérentes avec la littérature montrant des concentrations centrales en opioïdes endogènes bien moins importantes chez des animaux présentant des pathologies auto-immunes, notamment la souris MRL, que sur des animaux sains <sup>367</sup>. Nous avons également montré que les cellules exprimant le plus PENK étaient les ASCs. Ces données nous ont surpris puisque nous nous attendions à ce que ce soient les cellules immunitaires (macrophages ou lymphocytes) qui exprimaient PENK, comme cela est largement décrit dans la littérature <sup>351</sup>. Au regard de l'implication de telle ou telle sous-population de cellules immunitaires dans l'inflammation et sa résolution ou le remodelage de la MEC, Il serait aujourd'hui judicieux d'étudier plus finement l'expression de PENK dans plusieurs populations de cellulaires immunitaires: les neutrophiles, les macrophages M1 et M2, les lymphocytes innés résidents (ILC2), les LT, les LB, les NK.

De manière similaire à l'investigation des cytokines, il est important d'étudier en parallèle l'expression (ce que nous avons fait) et la sécrétion (ce qu'il nécessaire de faire) d'enképhaline aux temps déjà étudiés mais aussi à des temps plus courts (1-2-6h). En effet, puisque nos données montrent que la lipectomie induit, chez les MRL et les C57BL/6 traitées à la naloxone, une augmentation de la production d'EAOs associée à une augmentation du nombre de neutrophiles, on peut imaginer que les neutrophiles répondent (directement ou indirectement) aux opioïdes en modulant leur production d'EAOs. Ainsi, l'augmentation de la sécrétion d'enképhaline devrait être maximale 6h après lipectomie.



Le fait que les ASCs expriment fortement PENK est cohérent avec les travaux de Guo et coll. qui ont montré en 2014 que l'injection de CSMs (homologues des ASCs dans la moelle osseuse) dans les genoux de patients atteints d'arthrite diminue la douleur associée à cette pathologie. Les auteurs expliquent cet effet par l'action immuno-modulatrice des CSMs <sup>368</sup>. Nous pouvons facilement émettre ici l'hypothèse que l'effet analgésique des CSMs n'est pas exclusivement dû à leurs effets immuno-modulateurs mais également à la sécrétion, au moins d'enképhalines, par ces cellules. Cette hypothèse est d'autant plus pertinente qu'il est décrit que la greffe autologue de TA sous-cutané (qui contient un grand nombre d'ASCs), initialement utilisée pour augmenter les volumes mammaires, est aujourd'hui utilisée pour limiter le syndrome douloureux post-mastectomie <sup>369</sup>. On pourrait donc imaginer utiliser les ASCs pour diminuer les douleurs post-opératoires à la place de la morphine, qui présente de nombreux effets indésirables.

Sachant que les souris MRL, qui présentent une pathologie auto-immune, ont des concentrations d'opioïdes endogènes moins importantes que chez la souris C57BL/6 (littérature + nos données), et qu'elles régénèrent, il serait pertinent de savoir si d'autres pathologies auto-immunes (sclérose en plaque, basedow, diabète de type I...) sont systématiquement associées à une diminution de l'expression de PENK et à une plus grande capacité à régénérer. On peut raisonnablement s'y attendre puisque Sacerdote et coll. montrent que les concentrations en opioïdes au niveau du système nerveux central étaient diminuées chez le poulet atteint d'une pathologie auto-immune <sup>367</sup>. Il faudrait aussi évaluer la capacité de régénération des individus atteints de ces pathologies auto-immunes. Si cette hypothèse était validée (pathologie auto-immune associée à une diminution de l'expression de PENK et à une capacité intrinsèque à régénérer), il faudrait comprendre pourquoi le tonus d'opioïdes endogènes est moins important dans ces pathologies-là. Est-ce l'environnement immunitaire qui « conditionne » l'expression de PENK par les ASCs ou CSMs ? ou bien est-ce la moindre expression d'opioïdes endogènes par les cellules stromales qui « conditionne » des cellules immunitaires ?

Etant donné les différences notables entre le cœur et la périphérie du TA inguinal sur lequel nous avons étudié les conséquences d'une ablation massive, il serait pertinent d'étudier les différences d'expression de PENK dans la SLA et la





NSLA. Des résultats préliminaires du laboratoire montrent que la NSLA des souris C57BL/6 exprime plus fortement PENK que la SLA. Ainsi, si la sécrétion de PENK est différente en fonction de la partie du dépôt inguinal (SLA vs NSLA), on pourrait imaginer que la partie la « plus riche » en PENK (NSLA) aurait plus de difficulté à régénérer que la partie SLA. Cette hypothèse pourrait expliquer le fait que la lipectomie à l'apex entraîne une moins bonne récupération du TA que la lipectomie à l'aine (*Fig. 3*), la partie apex étant majoritairement composée de NSLA. Certains dépôts adipeux blancs présentent une structuration avec des lobules (de type SLA) alors que d'autres, non, et donc seraient majoritairement composés de NSLA (données préliminaires du labo). On peut donc imaginer une variabilité d'expression de PENK entre tous ces dépôts, et probablement des capacités à régénérer après lésion différentes.

Enfin, puisque les souris MRL ont un niveau d'expression génique de PENK moins important que les souris C57BL/6 au niveau central (données de la littérature) comme au niveau périphérique (nos données), on peut imaginer que ces souris ressentent de manière plus importante un signal nociceptif. Il serait pertinent d'observer si les souris MRL ont un seuil de réponse à la douleur plus bas que les souris C57BL/6. Le message nociceptif, qui est avant tout un signal d'alarme permettant de mettre en place des réflexes de fuite pourrait être, finalement, un élément fondamental pour le processus de régénération : une fois initié, le message nociceptif pourrait mettre « en alerte » l'ensemble de l'organisme (vascularisation, réorientation des flux métaboliques, mobilisation des cellules souches...) afin de privilégier les processus régénératifs (probablement au dépend des autres organes non touchés). D'un point de vue thérapeutique, il est éthiquement difficile de faire « souffrir » les personnes amputées pour favoriser une régénération. Cependant, on peut imaginer garder un message « nociceptif local » (probablement issu d'une inflammation locale intense et brève) tout en « trompant » ou « endormant » le cerveau en diminuant la perception douloureuse au niveau cérébral.



### C. Lien entre cellules immunitaires et opioïdes au cours de la réparation du TA

Nos résultats ont mis en évidence que : i) le traitement par un antagoniste des récepteurs  $\mu$  augmente la production d'EAOs, 6h après lipectomie, ainsi que le nombre de neutrophiles dans le tissu lésé et ii) les récepteurs  $\mu$  impliqués sont localisés sur les cellules immunitaires.

Dans notre modèle, étant donné que i) la greffe de cellules immunitaires  $\mu$  KO stimule la régénération du TA, ii) le traitement par un antagoniste des récepteurs aux opioïdes entraîne une augmentation du nombre de neutrophiles sur la zone de lésion 1h-2h-6h après la lésion (associée à une augmentation de la production d'EAOs), il semblerait que ce soient les cellules immunitaires qui répondent aux opioïdes. Nos résultats sont en adéquation avec la littérature qui décrit que les opioïdes, après lésion, agissent sur les cellules immunitaires<sup>335</sup>. Aujourd'hui, il apparaît indispensable d'identifier quelles sont les cellules immunitaires, au sein du TA, qui possèdent le récepteur  $\mu$  aux opioïdes, et d'évaluer si les neutrophiles répondent directement aux opioïdes en les triant à partir de souris C57BL/6 et C57BL/6 lipectomiées et traitées à la naloxone puis en mesurant *in vitro* leur production d'EAOs sous l'effet d'un traitement avec un agoniste des récepteurs aux opioïdes. Parallèlement à cela, *in vivo*, la production d'EAOs sera évaluée sur des souris C57BL/6 lipectomiées traitées à la naloxone, ayant été déplétées ou pas en neutrophiles (traitement avec l'anticorps bloquant Gr1 empêchant le recrutement des neutrophiles sur la zone de lésion). Si on n'observe plus la production d'EAOs 6h après la lipectomie, cela montrera que la naloxone agit directement sur les neutrophiles, *in vivo*.

De plus, il est très probable qu'après la lipectomie, les neutrophiles soient à leur tour capables de produire des opioïdes<sup>329</sup>. En retour, ces opioïdes seraient capables de modifier leur propre sécrétion et celles de molécules qui attirent et activent les macrophages sur la zone de lésion (MIP-2, MCP1). Ainsi, le nombre et l'activité des macrophages seraient modifiés comme décrit dans la littérature<sup>314</sup>. L'ensemble de cette hypothèse est cohérente avec le fait qu'après une lésion cutanée, la morphine diminue i) le nombre de neutrophiles sur la zone de lésion<sup>370,371,372</sup>, ii) leur activité myéloperoxydase<sup>370</sup> et iii) leur activité de phagocytose ainsi que l'amplitude du burst oxydatif<sup>373</sup> et iv) leur sécrétion de MCP-1 et de MIP-2 (assurant le recrutement



de macrophages) au niveau de la zone de lésion <sup>371,370</sup>. On serait donc ainsi face à une boucle d'amplification avec une première sécrétion d'opioïdes par les ASCs à l'origine d'un afflux de neutrophiles, eux-mêmes à l'origine d'une seconde sécrétion d'opioïdes entraînant un recrutement massif de macrophages.

Afin de valider que les neutrophiles, dans notre modèle, sont en capacité de sécréter PENK, on pourrait trier les neutrophiles, 1h-2h-6h après lipectomie. Si les neutrophiles des C57BL/6 présentaient une forte sécrétion de PENK après lipectomie, on pourrait alors imaginer, que la différence observée dans la réparation tissulaire entre les souris MRL et C57BL/6 ne seraient pas uniquement due à des différences en terme de présence cellules immunitaires adaptatives (LT, LB), mais également dans le nombre et/ou l'activation (donc la sécrétion de PENK) des neutrophiles. Il semblerait que le nombre de neutrophiles lors d'une infection d'une souris MRL ne soit pas modifié <sup>374</sup>. Cependant, aucune étude ne s'est intéressée à l'activation de ces cellules. Chez la souris C57BL/6, on peut imaginer que suite à une lésion, les ASCs (cellules « sensors » de la lésion) sécrètent PENK (ainsi que d'autres molécules permettant le recrutement des neutrophiles, comme le LTB4 ou le G-CSF), et que les neutrophiles augmentent leur sécrétion de PENK suite à leur recrutement sur la zone de lésion.

#### **D. Régénération et inhibition de la voie Hippo**

La voie Hippo est une voie impliquée dans le développement embryonnaire <sup>375</sup>. Elle est connue pour stopper la croissance de l'organe quand celui-ci a atteint la « bonne » taille. Dans les processus de régénération, la voie Hippo est également impliquée : l'inhibition de cette voie chez la drosophile, entraîne un hyper développement de l'intestin après ablation <sup>376</sup>. Chez les mammifères, la voie Hippo fait intervenir les protéines Mst1/2, Yap et Yki <sup>375</sup>. On pourrait alors imaginer qu'il existe une différence d'activation / inhibition de cette voie entre les souris MRL et C57BL/6. Les souris C57BL/6 pourraient par exemple présenter une activation plus importante de la voie Hippo, entraînant une inhibition de la régénération du TA. Ces données sont cohérentes avec le fait que la MRL présente une organomégalie importante : il est donc probable que cette souris présente une activation de la voie



Hippo moins importante que la souris C57BL/6. Même si le nombre d'études reste faible, il a été montré que dans des pathologies auto-immunes autres que celles de la MRL (maladie de Crohn, dermatite atopique), Mst-1 était inhibé, entraînant une prolifération incontrôlée des LT et LB, responsable de la pathologie auto-immune<sup>377</sup>. Au regard de l'ensemble de ces données, il serait donc intéressant d'étudier les différences d'activation des acteurs moléculaires de la voie Hippo après lipectomie chez les souris MRL et C57BL/6.

### **E. Ucp1 et opioïdes**

Nos données mettent en évidence que les souris Ucp1-KO régénèrent aussi bien que les souris C57BL/6 traitées avec la naloxone, bien qu'un traitement à la naloxone n'a pas d'effet additif sur la régénération du TA des souris Ucp1-KO. Puisque i) la protéine Ucp1 semble être un frein à la régénération et que ii) les souris MRL ont des TA plus volumineux que les souris C57BL/6 (on sait que l'activation d'Ucp1 après mise au froid entraîne une diminution de la masse graisseuse puisque cela augmente les dépenses énergétiques), on peut imaginer que les TA de ces souris aient des capacités moindres à « brunir » et donc essayer de stimuler Ucp1 (augmentation de l'expression ? de son activité ?) Ids souris MRL afin de voir si cela bloque leur régénération. De plus, on sait, depuis peu, qu'il existe un lien entre opioïdes et brunissement : Brestoff et coll. ont récemment mis en évidence que les Lymphoides Innate Cells (ILC2) présentes dans le TA, après activation par l'IL-33, libèrent des enképhalines. Cette sécrétion d'enképhalines entraîne une augmentation de l'expression d'Ucp1 et le « brunissement » du dépôt<sup>357</sup>. Ainsi l'activation de la protéine Ucp1 serait un frein à la régénération. Cette conclusion serait « physiologiquement cohérente » puisque l'activation de la protéine sous-tend une forte dépense énergétique par les cellules Ucp1 positives alors que le tissu en cours de régénération a besoin d'une grande quantité d'énergie (prolifération, migration cellulaire, différenciation, ...). Une partie de l'effet « pro-régénérant » du traitement avec l'antagoniste des récepteurs  $\mu$ , pourrait donc s'expliquer par une inhibition (ou un « non-recrutement ») des adipocytes beiges.

Au cours de notre étude, nous nous sommes principalement intéressés aux cellules immunitaires classiques (macrophages, lymphocytes) et ASCs mais au





Hippo moins importante que la souris C57BL/6. Même si le nombre d'études reste faible, il a été montré que dans des pathologies auto-immunes autres que celles de la MRL (maladie de Crohn, dermatite atopique), Mst-1 était inhibé, entraînant une prolifération incontrôlée des LT et LB, responsable de la pathologie auto-immune<sup>377</sup>. Au regard de l'ensemble de ces données, il serait donc intéressant d'étudier les différences d'activation des acteurs moléculaires de la voie Hippo après lipectomie chez les souris MRL et C57BL/6.

### **E. Ucp1 et opioïdes**

Nos données mettent en évidence que les souris Ucp1-KO régénèrent aussi bien que les souris C57BL/6 traitées avec la naloxone, bien qu'un traitement à la naloxone n'a pas d'effet additif sur la régénération du TA des souris Ucp1-KO. Puisque i) la protéine Ucp1 semble être un frein à la régénération et que ii) les souris MRL ont des TA plus volumineux que les souris C57BL/6 (on sait que l'activation d'Ucp1 après mise au froid entraîne une diminution de la masse graisseuse puisque cela augmente les dépenses énergétiques), on peut imaginer que les TA de ces souris aient des capacités moindres à « brunir » et donc essayer de stimuler Ucp1 (augmentation de l'expression ? de son activité ?) chez les souris MRL afin de voir si cela bloque leur régénération. De plus, on sait, depuis peu, qu'il existe un lien entre opioïdes et brunissement : Brestoff et coll. ont récemment mis en évidence que les Lymphoides Innate Cells (ILC2) présentes dans le TA, après activation par l'IL-33, libèrent des enképhalines. Cette sécrétion d'enképhalines entraîne une augmentation de l'expression d'Ucp1 et le « brunissement » du dépôt<sup>357</sup>. Ainsi l'activation de la protéine Ucp1 serait un frein à la régénération. Cette conclusion serait « physiologiquement cohérente » puisque l'activation de la protéine sous-tend une forte dépense énergétique par les cellules Ucp1 positives alors que le tissu en cours de régénération a besoin d'une grande quantité d'énergie (prolifération, migration cellulaire, différenciation, ...). Une partie de l'effet « pro-régénérant » du traitement avec l'antagoniste des récepteurs  $\mu$ , pourrait donc s'expliquer par une inhibition (ou un « non-recrutement ») des adipocytes beiges.

Au cours de notre étude, nous nous sommes principalement intéressés aux cellules immunitaires classiques (macrophages, lymphocytes) et ASCs mais au



regard de la littérature, il serait intéressant, dans notre modèle de lipectomie, d'étudier i) si le nombre d'ILC2 augmente à des temps courts (1h-2h-6h-24h) après lipectomie chez les souris C57BL/6 en comparaison des souris MRL ou C57BL/6 traitées à la naloxone et ii) si leur expression et sécrétion de PENK en condition basale et après lipectomie est différente d'une souche de souris à l'autre. On peut imaginer qu'après lésion, ces cellules, en parallèle des ASCs, produisent une quantité non négligeable d'opioïdes endogènes chez la souris C57BL/6, inhibant ainsi leur régénération.

Enfin, aucune donnée de la littérature ne décrit l'implication de ces ILC2 dans les souris MRL ou autres pathologies auto-immunes. Ces cellules ne sont pas non plus décrites dans les organismes dotés de cette capacité à régénérer. Ainsi il serait intéressant d'étudier s'il existe une corrélation entre l'apparition de ces cellules au cours de l'évolution et l'inhibition de la régénération.

## **F. Innervation, opioïdes et régénération**

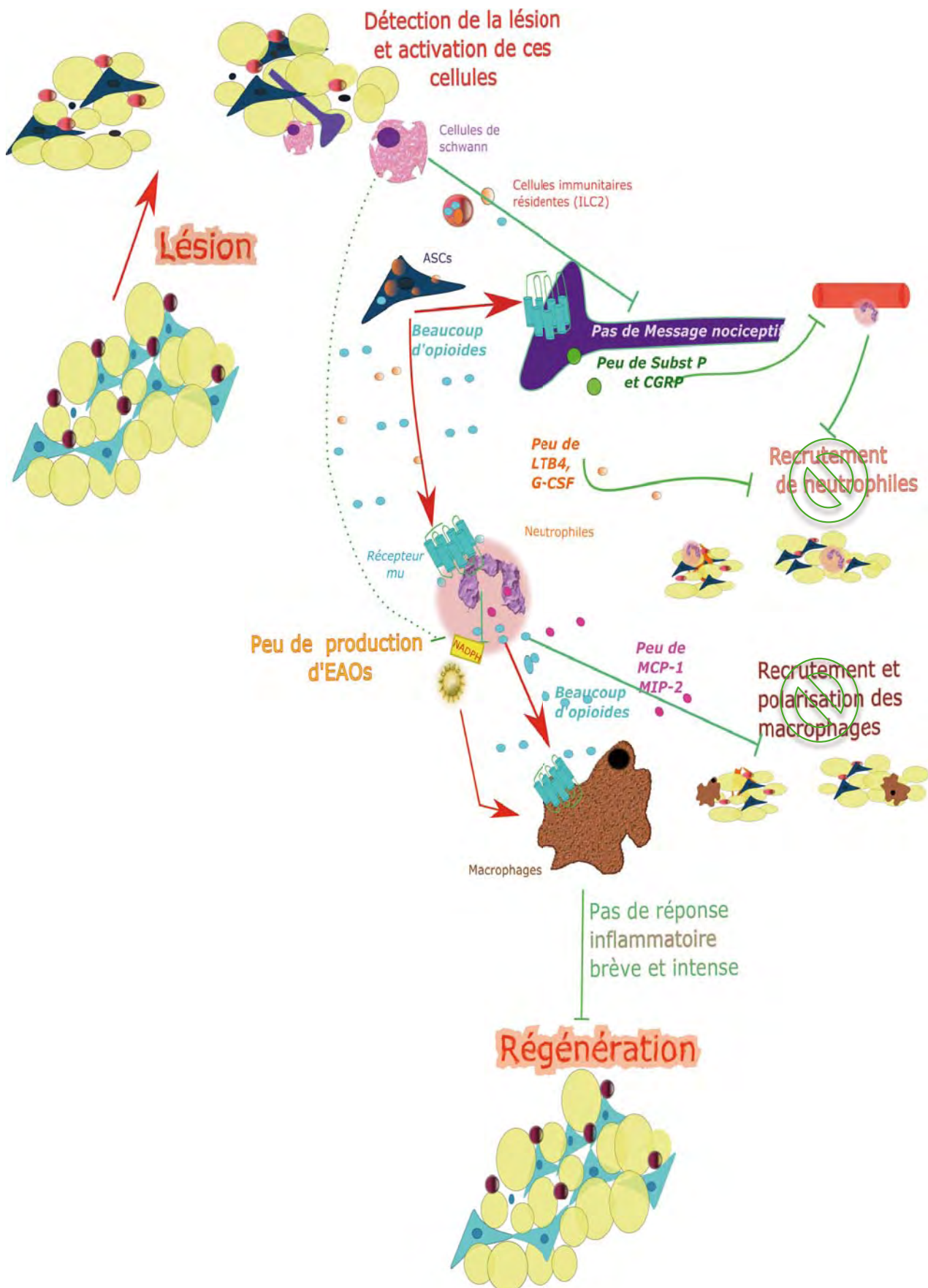
Au cours de notre étude, nous avons mis en évidence que les cellules immunitaires répondaient aux opioïdes ; ceci n'exclut pas une réponse par d'autres types cellulaires. On sait qu'après une lésion, les nocicepteurs sont activés par la libération de molécules inflammatoires, de facteurs de croissance ou par la production d'EOs. Il est également décrit qu'en réponse à l'activation de ces nocicepteurs, ces derniers libèrent localement de la substance P et du CGRP, ce qui augmente la vasodilatation et la perméabilité vasculaire favorisant l'extravasation des cellules immunitaires circulantes dans le sang jusque dans le tissu lésé. De manière concordante, Rook et coll. montrent que la morphine bloque la libération locale de SP et CGRP par les fibres nerveuses sensorielles. Cela induit une diminution de la vasodilatation et de la perméabilité vasculaire associée à une réduction du nombre de neutrophiles au niveau de la peau lésée, entraînant un retard de fermeture de la plaie<sup>344</sup>. Ainsi, chez la souris C57BL/6, on peut imaginer la séquence suivante : les ASCs « détectent » la lésion et produisent alors des opioïdes qui activent des récepteurs aux opioïdes présents sur les terminaisons nerveuses sensorielles. Cette activation inhibe la libération de SP et de CGRP, conduisant à un moindre recrutement de cellules immunitaires sur la zone de lésion. Pour valider cette



hypothèse, il faudrait tester l'effet d'une dénervation sensorielle chimique (par injection de fortes doses de capsaïcine) sur la capacité de régénération des souris MRL et C57BL/6 traitées à la naloxone. Pour déterminer si l'inhibition de la régénération est causée par la diminution de la libération de SP et CGRP due à la dénervation sensorielle, on peut imaginer, dans un second temps traiter ces souris dénervée avec des injections de SP et CGRP.

Comme décrit dans l'introduction (*cf chapitre 3, I*), après une lésion, les nocicepteurs sont activés et le message nociceptif sera intégré dans le système nerveux central. Ce message nociceptif, assimilé comme un « danger », déclenche alors une activation réflexe du système nerveux sympathique permettant la mise en place de stratégies assurant sa survie. Dans notre étude, nous n'avons pas étudié l'effet que pouvait avoir la libération des neurotransmetteurs du système nerveux sympathique autonome (noradrénaline et NPY) sur la régénération mais son implication n'est pas à ignorer. D'une part, il a été montré que le système nerveux sympathique, *via* la libération de noradrénaline était capable de contrôler l'état inflammatoire d'un tissu (orientation des macrophages de type M1 en M2, par exemple <sup>378</sup>) : dans notre cas, l'innervation autonome pourrait donc inhiber ou augmenter la réponse inflammatoire. D'autre part, dans le TA, on sait que le système nerveux autonome sympathique active la lipolyse : on peut imaginer que la libération d'AG permettrait de fournir l'énergie nécessaire à la prolifération, la migration et la différenciation des cellules du TA lésé afin de mener à bien la régénération. De plus, très récemment, des données montrent, au niveau de l'oreille après lésion, une surexpression des récepteurs au NPY (Y1 et Y5) chez les souris *Acomys* (qui régénère) <sup>379</sup>. Bien que les auteurs ne se soient pas intéressés au rôle du NPY sur la régénération de ces souris, il est fort probable, que l'activation des fibres nerveuses sympathiques (qui sécrètent noradrénaline et NPY) joue un rôle important dans les processus de régénération. Dans notre modèle, nous avons justement montré que le TA renferme un grand nombre de fibres nerveuses noradrénergiques et NPY. Il serait aujourd'hui intéressant d'évaluer s'il existe une différence d'innervation autonome sympathique entre les souris C57BL/6 et MRL et si une activation, par exemple des récepteurs adrénergiques et/ou des récepteurs au NPY des cellules du TA de souris C57BL/6 favorise une meilleure régénération.

Enfin, l'implication de l'innervation dans les processus de régénération n'est pas restreinte à l'activation des neurones sensoriels ou autonomes sympathiques. En



**Figure 65 : Schéma récapitulatif : pourquoi les souris C57BL/6 ne régèrent pas?**

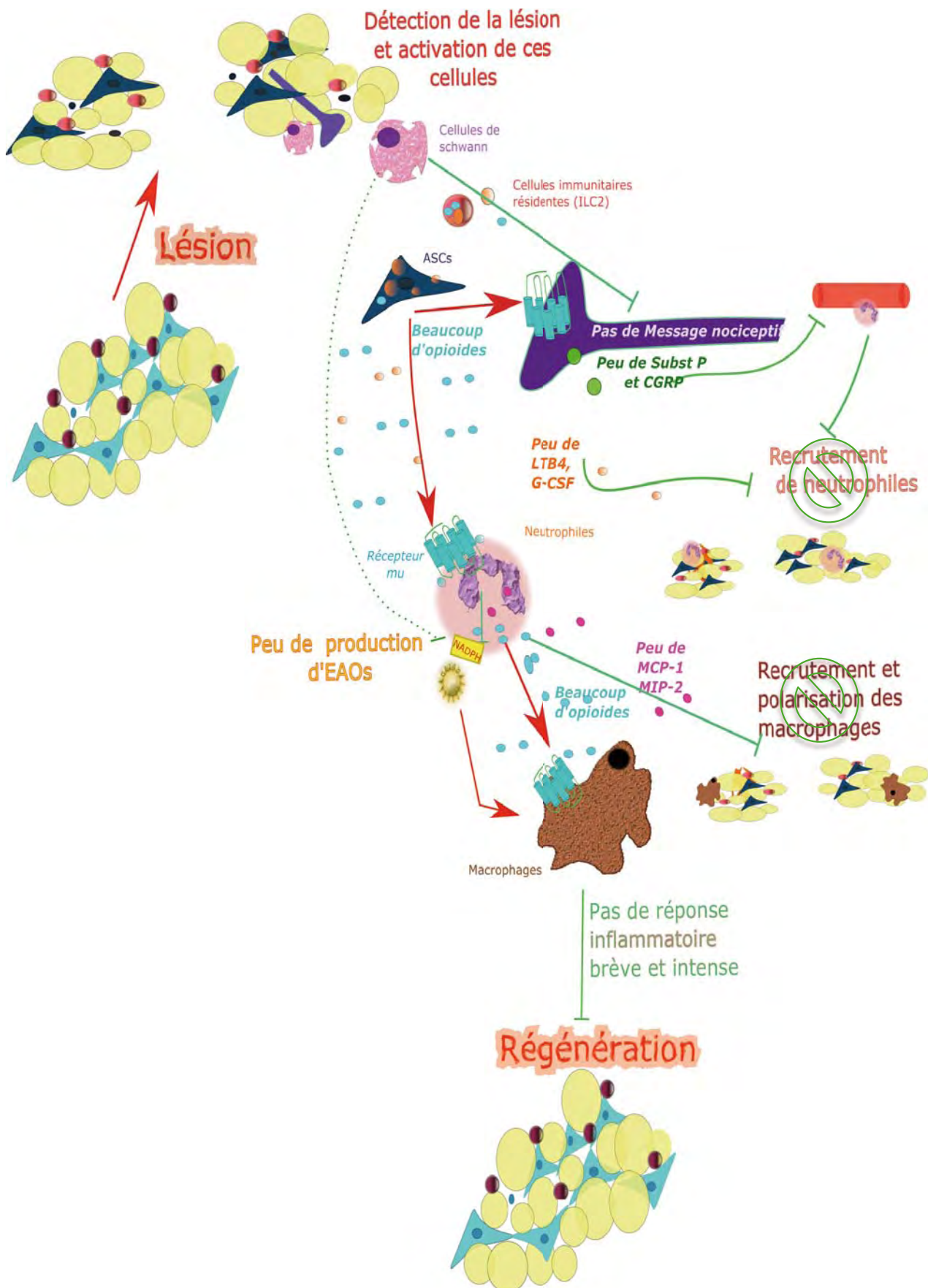
Après lésion, les ASCs détectent la lésion et libèrent des opioïdes, tout comme pourraient le faire les ILC2, présents sur les nocicepteurs, entraînant une diminution du message nociceptif. Peu de Substance P et CGRP est libéré, n'entraînant pas de vasodilatation et l'extravasation de cellules immunitaires. En parallèle, les opioïdes agissent également sur les neutrophiles en diminuant leur production d'EOs, indispensable pour le recrutement des macrophages. Les neutrophiles ne sécrètent pas ou peu de MIP-2 et MCP-1, ayant pour conséquence de diminuer encore le nombre de macrophages recrutés. Les neutrophiles peuvent à leur tour sécréter des opioïdes qui maintiendraient cet état « non inflammatoire ». On peut imaginer que les cellules de Schwann ne soient pas si actives ou moins nombreuses ayant pour conséquence une non stimulation de la production d'EOs.

Ainsi, la forte production d'opioïdes chez les C57BL/6, suite à une lésion, inhiberait la régénération tissulaire.

effet, les cellules de Schwann (cellules qui entourent les nerfs) sont impliquées dans la régénération chez la salamandre : ce sont ces cellules qui sécrètent le nAG (*cf Introduction, Chapitre 2, II, E*), indispensable à la régénération du membre <sup>185</sup>. De plus, il est décrit chez le poisson zèbre que les cellules de Schwann sont également responsables de la détection de la lésion et stimulent la production d'EOs, indispensable à la régénération (Conférence Bases moléculaires et cellulaires de la régénération, Janvier 2016, Keystone, poster de Vríz Sophie). Au regard des données de la littérature et puisque nos observations montrent que le TA renferment une grande quantité des cellule de Schwann (*cf Productions Scientifiques, Chapitre 1*), on peut imaginer que dans notre modèle, que ces cellules soient nécessaires voire indispensables, à la détection de la lésion, et pourraient stimuler la production d'EOs, par exemple.

L'hypothèse relative à l'absence de régénération chez les mammifères, que je formule est donc la suivante (*Fig. 65 et Fig. 66*):

- 1) Les ASCs, les cellules de Schwann et les cellules immunitaires résidentes détectent la lésion et produisent des opioïdes (ou produisent peu d'autres molécules : LTB-4, G-CSF).
- 2) Les opioïdes se fixent sur les récepteurs aux opioïdes des nocicepteurs qui vont diminuer leur libération locale de SP et CGRP, entraînant une diminution du recrutement des cellules immunitaires.
- 3) Les opioïdes agissent également sur les neutrophiles en diminuant leur production d'EOs, leur activité de phagocytose et leur sécrétion de MCP-1 et MIP-2.
- 4) Le nombre de macrophages recrutés sur la zone de lésion est plus faible et i) la réaction inflammatoire intense et brève ii) suivie d'une résolution de l'inflammation n'auront pas lieu.
- 5) A long terme, les processus de régénération seront inhibés en faveur des mécanismes de cicatrisation.



**Figure 65 : Schéma récapitulatif : pourquoi les souris C57BL/6 ne régénèrent pas?**

Après lésion, les ASCs détectent la lésion et libèrent des opioïdes, tout comme pourraient le faire les ILC2, présents sur les nocicepteurs, entraînant une diminution du message nociceptif. Peu de Substance P et CGRP est libéré, n'entraînant pas de vasodilatation et l'extravasation de cellules immunitaires. En parallèle, les opioïdes agissent également sur les neutrophiles en diminuant leur production d'EOs, indispensable pour le recrutement des macrophages. Les neutrophiles ne sécrètent pas ou peu de MIP-2 et MCP-1, ayant pour conséquence de diminuer encore le nombre de macrophages recrutés. Les neutrophiles peuvent à leur tour sécréter des opioïdes qui maintiendraient cet état « non inflammatoire ». On peut imaginer que les cellules de Schwann ne soient pas si actives ou moins nombreuses ayant pour conséquence une non stimulation de la production d'EOs.

Ainsi, la forte production d'opioïdes chez les C57BL/6, suite à une lésion, inhiberait la régénération tissulaire.



## **G. La régénération du TA : son intérêt en thérapeutique**

Indépendamment des données scientifiques qu'il apporte, notre travail pourrait avoir des implications physiopathologiques et/ou thérapeutiques. Le fait d'avoir étudié l'implication des opioïdes dans la réparation tissulaire du TA pourrait nous permettre de mieux gérer l'utilisation de la morphiniques (agonistes des récepteurs aux opioïdes) après une opération. Comme décrit dans l'introduction, la reconstruction mammaire par greffe de TA autologue nécessite plusieurs greffes pour atteindre un résultat satisfaisant <sup>116</sup>. Au regard de nos données indiquant que l'utilisation d'un agoniste des récepteurs aux opioïdes (tramadol) inhibe la régénération, peut être que le fait de ne pas associer de traitement post-opératoire morphinique à la greffe autologue de TA pourrait améliorer la reconstruction mammaire. L'effet inhibiteur des morphiniques sur la régénération du TA est cohérent avec les données qui montrent que la morphine retarde la fermeture de la plaie cutanée ou la récupération fonctionnelle de la cornée suite à son abrasion <sup>347,345,344</sup>. Puisque, dans notre modèle nous montrons que le traitement à la naloxone induit une inflammation intense et brève, responsable de la régénération, on pourrait imaginer combiner l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs  $\mu$  aux opiacés localement (naloxone) pour favoriser le maintien du volume de TA greffé (voire en augmenter le volume) et y associer un analgésique non opioïde en central pour diminuer la douleur associée à la greffe et à l'inflammation locale. Inversement, lors d'une dermolipectomie ou d'une liposuction, dans le cadre desquelles une régénération du TA n'est pas souhaitée, on pourrait envisager d'optimiser le traitement post opératoire avec des agonistes des récepteurs aux opioïdes afin de s'assurer que le peu de TA restant après la chirurgie, ne régénère pas.

Enfin, lors du diabète, les patients sont atteints de neuropathies entraînant des douleurs chroniques <sup>380</sup>. Ils peuvent alors recevoir, dans certains cas, de fortes doses d'agonistes morphiniques <sup>381</sup>. Lors du diabète, les patients souffrent d'ulcères. L'ulcère est le processus de réparation inverse de la cicatrisation puisqu'à la place d'un dépôt excessif de collagène, la lésion reste « ouverte ». D'après nos données sur le TA ainsi que les données de la littérature, la morphine inhibe la régénération, l'utilisation de la morphine chez les patients diabétiques ayant des ulcères empirerait donc l'ulcère.



Le diabète de type II est associé à une expansion du TA caractéristique de l'obésité. On peut émettre l'hypothèse qu'une expansion du TA peut être due, en partie, à un tonus basal moins important d'opioïdes endogènes. Une diminution d'opioïdes endogènes pourrait à la fois expliquer : i) l'état pro-inflammatoire du TA, ii) une augmentation du volume du TA et iii) l'augmentation de la sensation douloureuse chez les diabétiques de stade avancé. Il est tout de même à rappeler que la sécrétion d'enképhalines par les ILC-2 présentes dans le TA stimule l'expression d'Ucp1 et donc un brunissement de ce dépôt <sup>357</sup>. Chez des patients présentant une hypertrophie des TA, on pourrait envisager essayer d'augmenter l'activité de ces cellules localement pour augmenter la production d'opioïdes endogènes et favoriser le « brunissement » de leurs TA.

*Pour conclure, nous avons choisi, pour étudier la régénération chez les mammifères adultes, d'utiliser le TA comme modèle d'étude car i) il contient un grand nombre de cellules stromales mésenchymateuses (cellules aux mêmes propriétés que les cellules qui constituent la blastema chez la salamandre <sup>382</sup>), ii) il renferme une grande quantité de fibres nerveuses autonomes et sensorielles (dont on sait qu'elles sont impliquées dans le contrôle régénération chez la salamandre, le poisson zèbre ou l'oreille de la souris MRL et iii) il est facilement accessible : l'acte de lipectomie n'est pas un acte de chirurgie lourde. Les données de la littérature associées à l'ensemble de mon travail montrent que ce tissu est loin d'être un tissu anodin, puisqu'il renferme un grand nombre de cellules immunitaires qu'elles soient résidentes ou circulantes, innées ou adaptatives, et que ces cellules répondent aux opioïdes. C'est grâce à ce modèle, qu'au cours de ma thèse j'ai mis le doigt sur un lien entre cellules stromales – opioïdes – cellules immunitaires et régénération. Il est aussi important de noter, que ce soit pour l'oreille de la souris MRL ou chez les vertébrés inférieurs, toute régénération est associée à une apparition (transitoire) d'adipocytes <sup>169,383</sup>. On peut alors se demander si ces adipocytes –même transitoires - n'auraient pas un rôle trophique et « endocrine » pour « primer », « guider », « orienter » les cellules indifférenciées assurant la régénération. Ainsi, le TA, tissu dont les cellules fonctionnelles sont les adipocytes, ne serait-il pas un tissu de choix pour élucider les processus cellulaires et moléculaires qui permettent la régénération ?*



# ANNEXES

---



1     **Corrupted adipose tissue endogenous myelopoiesis initiates diet-induced metabolic disease**

2     Elodie Luche<sup>1</sup>, Celine Pomié<sup>2</sup>, Vincent Cuminetti<sup>1</sup>, Emmanuelle Arnaud<sup>1</sup>, Audrey Varin<sup>3</sup>

3     Elodie Labit<sup>1</sup>, Patrick Laharrague<sup>1</sup>, Remy Burcelin<sup>2†</sup>, Louis Casteilla<sup>1†</sup> and Beatrice Cousin<sup>1\*</sup>

4     <sup>1</sup> STROMALab, Université de Toulouse, CNRS ERL 5311, EFS, INP-ENVT, Inserm U1031,  
5     UPS; <sup>2</sup> INSERM U1048 ; <sup>3</sup> STROMALab, Université de Toulouse, EFS, INP-ENVT, Inserm  
6     U1031, UPS; BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France.

7     <sup>†</sup> these authors contributed equally to this work.

8

9     \*Corresponding autor: Beatrice Cousin – STROMALab - Université de Toulouse, CNRS  
10     ERL 5311, EFS, INP-ENVT, Inserm U1031, UPS – BP 84225 – 31432 Toulouse Cedex 4 –  
11     France ; (33)5 612 837 20 ; [beatrice.cousin@inserm.fr](mailto:beatrice.cousin@inserm.fr)

12

13

14     Conflict of interest statement: The authors have declared that no conflict of interest exists.

1

## 2 INTRODUCTION

3 Over the last two decades, a critical role of adipose tissue macrophages (ATM) in the  
4 initiation of the metabolic inflammation, commonly found in highly prevalent chronic  
5 diseases such as obesity, has been largely documented <sup>1</sup>. At the onset of high-fat diet (HFD)-  
6 induced metabolic disease, accumulating ATM exhibit an inflammatory phenotype  
7 characterized by CD11c expression and this contributes to adipocyte dysfunction and insulin  
8 resistance <sup>2,3</sup>. In addition, an increased number of ATM worsens features of metabolic disease  
9 <sup>4,5</sup>, whereas a reduced number of ATM is associated with a reduced metabolic inflammation  
10 and an improved metabolic status <sup>6</sup>.

11 The cellular mechanisms promoting the accumulation of inflammatory immune cells in the  
12 adipose tissue (AT) remain poorly understood. So far, it is of common knowledge that  
13 macrophages invading the AT originate from the bone marrow (BM) via blood circulation <sup>7</sup>  
14 notably in response to AT inflammation which has been shown to trigger the proliferation of  
15 BM hematopoietic progenitors and myelopoiesis, that in turn perpetuate local maladaptive  
16 inflammatory response <sup>8-11</sup>. However, an unresolved question concerns the initiation of this  
17 AT inflammation.

18 Recently, we and others demonstrated the presence of a peculiar functional resident  
19 hematopoietic stem/progenitor cells (LSK) population in the AT <sup>12-14</sup> that can renew innate  
20 immune cells via *in situ* differentiation. To study the role of AT-LSK in the initiation of  
21 metabolic inflammation, we transplanted the corresponding cells from diabetic or control  
22 mice to their counterpart recipient mice, exploring therefore their capacity to transfer the  
23 metabolic phenotype and demonstrate their causal role. We show here that inflammatory  
24 ATM that induce metabolic disease development, originate from resident AT-LSK.



Conversely to medullar cells, we demonstrate that AT-LSK are a regulatory set point of metabolic disease. Altogether our results provide a new mechanism for the increase in pro-inflammatory ATM in metabolic diseases and point out AT-LSK as novel regulator of metabolic disease.

## RESULTS

### **Inflammatory ATM accumulating in HFD mice derived from AT-LSK differentiation.**

To investigate the origin of inflammatory macrophages in adipose tissue during metabolic disease, chimeric mice were generated by using standard competitive repopulation assays as previously described<sup>13</sup> by injecting  $2.10^3$  sorted AT-LSK mixed with  $2.10^5$  congenic BM cells isolated from congenic CD45 variants. Two months after transplantation, chimeric mice were fed either a normal chow or a HFD during 12 weeks (Fig. 1a). This diet has been previously described to induce insulin resistance and dysglycemia in mice<sup>15,16</sup>.

We first characterized the metabolic and inflammatory profiles of these chimeric mice. As expected, after 12 weeks on HFD, chimeric mice became glucose intolerant as revealed by intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT) (Fig. 1b), their fasting glucose and insulin levels were significantly higher from that of normal chow fed mice (Fig. 1c, 1d), and their AT exhibited insulin resistance as shown by reduced glucose utilization in response to insulin (Fig. 1e).

A significant increase in macrophage proportion ( $F4/80^+/CD11b^+$ ) was observed in the AT of HFD chimeric mice compared to controls (Fig. 1f). This was associated with a higher expression of inflammatory cytokines (Il-1 $\beta$ , PAI1 and CCL2) in the AT (Fig. 1g) confirming that HFD induces a metabolic inflammation in the AT of chimeric mice.

1 The origin of ATM was then determined by analysis of CD45.1 and CD45.2 expression. After  
2 12 weeks of HFD, the population of ATM deriving from AT-LSK significantly increased  
3 ( $3 \pm 0.7 \times 10^4$  CD45.1<sup>+</sup> ATM per fat pad in controls vs  $7 \pm 1.3 \times 10^4$  in HFD) in contrast to the  
4 one deriving from the BM (Fig. 1h, 1i), due to an increase in inflammatory CD11c<sup>+</sup>  
5 macrophage number without any change in anti-inflammatory CD206<sup>+</sup> ATM content (Fig. 1j).  
6 Thus in HFD chimeric mice,  $55 \pm 6\%$  and  $58 \pm 5\%$  of total- and CD11c<sup>+</sup> ATM respectively  
7 originated from AT-LSK and were thus produced *in situ*. Finally a significant positive  
8 correlation between CD45.1<sup>+</sup> ATM content (derived from AT-LSK) and glucose intolerance  
9 was drawn (Fig. 1k) suggesting a relationship between AT-LSK hematopoietic activity and  
10 metabolic disease.

11 These results showed that in HFD mice, the increase in ATM number was mainly due to an  
12 over production of ATM originating from AT-LSK differentiation.

13 **Specific depletion of ATM derived from AT-LSK improves glucose metabolism.** To  
14 confirm the crucial role of inflammatory ATM derived from AT-LSK in metabolic  
15 inflammation, a similar hematopoietic competitive repopulation assay was performed, using  
16 AT-LSK isolated from CD45.2<sup>+</sup> mice expressing the diphtheria toxin receptor (DTR) under  
17 control of the full CD11c promoter<sup>17</sup>. After 12 weeks of HFD, chimeric mice received  
18 diphtheria toxin (DT) in order to specifically remove CD11c<sup>+</sup> ATM deriving from AT-LSK  
19 (Fig. 2a).

20 Treatment with DT induced a specific and drastic depletion in inflammatory ATM derived  
21 from AT-LSK (CD11c<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup>/CD45.2<sup>+</sup>) without any change in ATM of medullar  
22 origin (Fig. 2b, 2c). In DT-treated mice, a decrease in the expression of inflammatory  
23 cytokines compared to HFD non treated mice was measured in the AT (Fig. 2d).

1 The DT treatment did not modify body weight gain (data not shown) but significantly  
2 improved glucose intolerance (Fig. 2e). Fasting glucose and insulin levels were not modified  
3 by DT treatment (Fig. 2f, 2g).

4 Altogether this *in vivo* approach demonstrates that the specific depletion of inflammatory  
5 ATM derived from AT-LSK improves both inflammatory and metabolic status in HFD mice.  
6 This suggested that a modification of AT-LSK activity may be one of the regulatory  
7 mechanism in the pathogenesis.

8 **Adoptive transfer of metabolic disease by transplantation of AT-LSK sorted from HFD**  
9 **mice.** To test whether AT-LSK may play a causal role in the development of metabolic  
10 disease, competitive repopulation assays were performed with AT-LSK sorted from either  
11 HFD or control CD45.1<sup>+</sup> mice. Both groups of chimeric mice were then maintained on normal  
12 diet after reconstitution (Fig. 3a).

13 Total chimerism (% of CD45.1<sup>+</sup> cells among total CD45<sup>+</sup> cells) was similar, although weak,  
14 in the AT of both groups of mice (4.5±0.9 vs 7.1±1.7% in chimeric mice transplanted with  
15 AT-LSK sorted respectively from control or HFD mice), and no seeding was measured in the  
16 BM (data not shown). Transplantation of AT-LSK sorted from HFD mice induced a  
17 significant increase in AT-LSK derived ATM (Fig. 3b; 3c), especially CD11c<sup>+</sup> ATM, without  
18 any change in CD206<sup>+</sup> ATM (Fig. 3d). BM-derived ATM remained unchanged (Fig. 3c). An  
19 increased expression of inflammatory cytokines such as IL-6, PAI-1 and CCL2 (Fig. 3e) in  
20 the AT was associated with changes in ATM content. Mice transplanted with AT-LSK sorted  
21 from HFD mice were glucose intolerant (Fig. 3f), exhibited increased fasted plasmatic  
22 glucose (Fig. 3g) and insulin (Fig. 3h) levels and their AT was insulin resistant (Fig. 3i)  
23 compared to mice transplanted with control AT-LSK. Altogether these data demonstrate that  
24 AT-LSK sorted from HFD mice are able to induce the onset of metabolic disease when

1 transplanted *in vivo* in control mice maintained on normal diet, via their sustained potential to  
2 generate inflammatory ATM.

3 **Specificity of AT-LSK vs BM-LSK.** It has been proposed that myeloid cell production by  
4 BM-LSK is potentiated by HFD and may be responsible for generation of inflammatory  
5 ATM<sup>10</sup>. To determine the specificity of AT-LSK in the induction of metabolic disease, we  
6 performed competitive repopulation assays with BM-LSK sorted from control or HFD mice.  
7 Both the number of ATM derived from BM-LSK (Fig. 4a, 4b), and the expression of  
8 inflammatory cytokines in the AT (Fig. 4c) were similar in mice transplanted with BM-LSK  
9 isolated from control or HFD mice. Glucose intolerance (Fig. 4d), fasted glucose and insulin  
10 levels (Fig. 4e; 4f) were not modified either. These data clearly demonstrate that BM-LSK are  
11 not involved in the initiation of AT-inflammation, and thus show the specificity of AT-LSK in  
12 the induction of metabolic disease.

13 To understand the differential effect of BM- and AT-LSK in inducing metabolic disease, we  
14 compared the myeloid profile of AT- and BM-LSK sorted from control and HFD mice on the  
15 basis of early myeloid committed progenitor signature<sup>18</sup>. Unlike BM-LSK, AT-LSK from  
16 HFD mice exhibited increased myeloid gene expression such as M-CSF and GM-CSF  
17 receptors, Lysozyme, Very-Low-Density-Lipoprotein Receptor, or Early Growth Response 2  
18 (Fig. 4g), indicating that HFD induced myeloid lineage priming of AT-LSK. This suggested  
19 that AT-LSK were able to specifically respond to environmental challenge.

20 **Therapeutic effect of healthy AT-LSK transplantation in HFD mice.** Finally, to test  
21 whether transplantation of control AT-LSK could improve the metabolic profile of HFD mice,  
22 we performed competitive repopulation assays with AT-LSK sorted from HFD or control  
23 donor mice grafted in HFD recipient mice. The chimeric mice were then maintained on HFD  
24 for 2 weeks (Fig. 5a). Transplantation of AT-LSK sorted from control mice into HFD mice

1 induced an improvement in glucose tolerance (Fig. 5b), a decreased in fasting glucose and  
2 insulin levels (Fig. 5c, 5d), as well as an improvement of AT-insulin sensitivity (Fig. 5e).  
3 These data demonstrated that restoring a physiological AT-LSK activity in AT improve  
4 significantly metabolic parameters.

## 6 **DISCUSSION**

7 We have previously demonstrated the presence in AT of an endogenous functional  
8 hematopoietic process, based on the presence of a peculiar resident LSK population<sup>13,19</sup>. In  
9 steady states, AT-LSK are able to partly reconstitute immune cell compartment in AT or other  
10 organs except classic hematopoietic ones<sup>13,14</sup>, demonstrating the specificity of this  
11 extramedullary hematopoietic process. Here we show the crucial and specific role of AT-LSK  
12 in the development of metabolic disease. Indeed, the transfer of AT-LSK sorted from HFD  
13 mice to control mice induces metabolic disease, and AT inflammation. In contrast,  
14 transplantation of BM-LSK isolated from HFD-fed mice did not induce pro-inflammatory  
15 AT accumulation nor the pathology emphasising the importance of AT-LSK rather than  
16 BM-LSK in this pathological context.

17 Consistent with literature<sup>8-11</sup>, we also observed an increase in macrophage populations in the  
18 BM of chimeras under HFD. However, and contrary to what is generally admitted, this  
19 increase is not responsible for the accumulation of ATM, and the subsequent metabolic  
20 inflammation in the AT. Therefore, our results demonstrate that the accumulation of ATM in  
21 HFD mice, which is a largely described hallmark of obesity and diabetes<sup>2,3,7,20,21</sup> originate  
22 from resident AT-LSK, rather than from the BM. The traditional view states that all  
23 accumulating tissue-resident macrophages in metabolic disease derive from the BM through  
24 circulating monocyte intermediates<sup>7</sup>. However, to reach these conclusions, the authors used

1 mice reconstituted with BM cells. In this case, as previously described<sup>13</sup> AT-LSK pool is not  
2 reconstituted and thus AT-immune cells effectively infiltrate the tissue, originating from the  
3 BM.

4 In diabetic context, AT-LSK generates pro-inflammatory ATM that exhibit deleterious effects  
5 on metabolism. The induction of AT inflammation and glucose intolerance has already been  
6 described after transfer of activated antigen-presenting cells into normal mice<sup>22</sup>. However we  
7 underline here the specific role of AT-LSK derived-ATM, since their depletion in diabetic  
8 mice ameliorates metabolic features. The accumulation of pro-inflammatory ATM originating  
9 from AT-LSK in HFD-fed mice is consistent with the upregulation of some receptors and  
10 transcription factors involved in myeloid differentiation. Several transcription factors among  
11 which C/EBP $\alpha$ , Egr, Klf4 or receptors (TLR, CSF1R) are known to induce HSC proliferation  
12 and/or bias toward myeloid cell production<sup>23</sup>. This suggests that under HFD, AT-LSK are  
13 reprogrammed to generate pro-inflammatory ATM, and are thus able to specifically respond  
14 to environmental challenges as it has been shown for BM-HSC<sup>18</sup>.

15 This work also shows that ATM derived from AT-LSK have a different and overriding role  
16 compared to BM-derived ATM, although both macrophage populations coexist in the AT. This  
17 is consistent with recent data showing the remarkable functional diversity of tissue  
18 macrophages according to their origin. Indeed, macrophages produced in medullary and  
19 extramedullary tissues differ, and may be differently involved in the steady state or in  
20 pathological conditions<sup>24,25</sup>.

21 In conclusion our data demonstrate the pivotal role of resident AT-LSK in the induction of  
22 metabolic disease, and underline the importance of ATM originating from endogenous AT  
23 hematopoietic activity compared to the one derived from circulating monocytes. These data  
24 add thus new insights in the actual debate around macrophage ontogeny, and the contribution

of different macrophage populations in tissue homeostasis<sup>26</sup>. Considering the abundance of AT in the body, and the generalized presence of AT-LSK in all deposits<sup>19</sup>, close to most of the major vital organs, the involvement of endogenous AT hematopoietic process in disease needs further investigation.

## **METHODS**

### *Animal models and dietary treatments*

Experiments were performed on 6- to 8- week-old male C57BL/6J CD45.2 mice and congenic male C57BL/6J CD45.1 mice. Animals were housed in a controlled environment (12-hour light/dark cycles at 21°C) with unrestricted access to water and diet. Mice were fed with a normal chow diet (NC; 12% fat, 28% protein, and 60% carbohydrate) or a high-fat diet (HFD, 72% fat, 28% protein, and <1% carbohydrate) for 8 to 12 weeks. For AT-CD11c<sup>+</sup> cell depletion, mice transplanted with AT-LSK sorted from CD11c-DTR transgenic mice were injected i.p. with diphtheria toxin at a dose of 10ng/g body weight at day -4, -2 and 0 before the GTT and flow cytometry analyses. Before removal of tissues, mice were killed by cervical dislocation.

### *Isolation of AT and BM cells*

Bone Marrow (BM) cells were flushed from the femurs with  $\alpha$ -MEM medium (Life Technologies). Subcutaneous inguinal adipose tissue (AT) was dissected and mechanically dissociated. AT fragments were digested with collagenase and stroma-vascular (SVF) cells were collected by centrifugation after elimination of undigested fragments by filtration as described previously<sup>14</sup>. Red blood cells were removed by incubation in hemolysis buffer. Cells were counted and used for flow cytometric analysis or LSK sorting.

### *Competitive repopulation assays*

1 Competitive repopulation assays were conducted as described previously<sup>13,14</sup>. Briefly,  $2 \times 10^3$   
2  $\text{Lin}^-/\text{Sca-1}^+/\text{c-Kit}^+$  (LSK) cells sorted from the AT or the BM of donor mice were mixed with  
3  $2 \times 10^5$  competitor BM total cells. The mixed population was intra-venously injected into  
4 lethally irradiated (10Gy, 137Cs source) recipient mice. Reconstituted mice were then  
5 allowed to recover during 2 months. To allow monitoring of the LSK progeny, we used the  
6 CD45.1/CD45.2 mismatch system. AT- or BM-LSK expressing either CD45.1 or CD45.2  
7 were transplanted respectively in CD45.2 or CD45.1 expressing mice together with BM cells  
8 that have the same genotype that the recipient mice.

#### 9 *Flow cytometry analysis and cell sorting.*

10 Flow cytometry was used to characterize adipose tissue macrophages (ATM) as described  
11 previously<sup>14</sup>. Freshly isolated SVF cells were stained in PBS containing FcR-blocking  
12 reagent. Phenotyping was performed by immunostaining with conjugated rat anti-mouse  
13 mAbs and comparing with isotype-matched control mAb. Cells were washed in PBS and  
14 analyzed on a FACS Canto II flow cytometer. Data acquisition and analysis were performed  
15 using Kalusa Version 1.2 software.

16 For LSK cell-sorting experiments, SVF cells were stained with FITC-conjugated Ly-6A/E  
17 (Sca-1), PE-Cy7-conjugated CD117 (c-Kit) antibodies, and APC-conjugated Lineage Panel.  
18 Cells negative for lineage markers were gated, and Sca-1 and CD117 double-positive cells  
19 were sorted. The degree of the enrichment of HSC determined by flow cytometry was  
20 between 92% and 97%.

#### 21 *Monitoring metabolic parameters*

22 For the intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT) mice fasted for overnight or 6hr were  
23 injected with a 20% glucose solution at a dose of 1g glucose/kg body weight. Glycemia was



1 determined by the use of a glucose meter on samples of blood collected from the tip of the tail  
2 vein. The area under the curve (AUC) was determined. Plasma insulin concentration was  
3 assessed from blood collected from fasted (for 6 hours) mice by ELISA according to the  
4 manufacturer's instructions. Euglycemic hyperinsulinemic clamps were performed<sup>27</sup>. Briefly,  
5 the mice were fasted for 6 hours and were infused at a rate of 18 or 4 mU.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> of  
6 insulin for 3 hours. Simultaneously, a 20% glucose solution was infused to maintain a steady  
7 glycemia. To determine an index for the individual AT glucose use rate, a flash injection  
8 through the femoral vein of 30 µCi per mouse of D-2- [3H]deoxyglucose was performed 60  
9 min before the end of the infusions. Individual tissue glucose uptake measurement in AT was  
10 determined as previously described<sup>28</sup>.

#### 11 *RNA Extraction and Real-Time PCR*

12 Total RNA from mouse tissues was isolated by Qiazol extraction and purification was done  
13 using RNeasy minicolumns. For quantitative real-time PCR analysis, RNA was reverse  
14 transcribed using a cDNA Reverse Transcription kit, SYBR Green PCR Master Mix, and 300  
15 nmol/L primers on an Applied Biosystem StepOne instrument. Relative gene expression was  
16 calculated by the  $\Delta\Delta CT$  method, normalized to 36B4, and expressed in percent of control  
17 values.

#### 18 *Statistical analyses*

19 All results are given as means  $\pm$  SEM. Comparisons between groups were made with the  
20 unpaired Mann and Whitney. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 21 *Study Approval*

22 Animals were maintained in accordance to guidelines of the European Community Council.  
23 All experimental procedures were done in compliance with European regulations for animal

experimentation. The authors have received requested approval from their Institutional Ethic Committee, and from Ministry of National Education, Higher Education and Research (# 2691-2015110616015905) for all the experiments performed.

#### REFERENCES

- 1 Chawla, A., Nguyen, K. D. & Goh, Y. P. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol* **11**, 738-749 (2011).
- 2 Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* **117**, 175-184 (2007).
- 3 Lumeng, C. N., DelProposto, J. B., Westcott, D. J. & Saltiel, A. R. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes* **57**, 3239-3246 (2008).
- 4 Hirasaka, K. *et al.* Deficiency of Cbl-b gene enhances infiltration and activation of macrophages in adipose tissue and causes peripheral insulin resistance in mice. *Diabetes* **56**, 2511-2522 (2007).
- 5 Kamei, N. *et al.* Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem* **281**, 26602-26614 (2006).
- 6 Kanda, H. *et al.* MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* **116**, 1494-1505 (2006).
- 7 Weisberg, S. P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* **112**, 1796-1808 (2003).
- 8 Nagareddy, P. R. *et al.* Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytosis in obesity. *Cell Metab* **19**, 821-835 (2014).

1 9 Nagareddy, P. R. *et al.* Hyperglycemia promotes myelopoiesis and impairs the  
2 resolution of atherosclerosis. *Cell Metab* **17**, 695-708 (2013).

3 10 Singer, K. *et al.* Diet-induced obesity promotes myelopoiesis in hematopoietic stem  
4 cells. *Mol Metab* **3**, 664-675 (2014).

5 11 Singer, K. *et al.* Differences in Hematopoietic Stem Cells Contribute to Sexually  
6 Dimorphic Inflammatory Responses to High Fat Diet-induced Obesity. *J Biol Chem*  
7 **290**, 13250-13262 (2015).

8 12 Han, J. *et al.* Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional  
9 hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **115**, 957-964 (2010).

10 13 Poglio, S. *et al.* In situ production of innate immune cells in murine white adipose  
11 tissue. *Blood* **120**, 4952-4962 (2012).

12 14 Poglio, S. *et al.* Adipose tissue as a dedicated reservoir of functional mast cell  
13 progenitors. *Stem Cells* **28**, 2065-2072 (2010).

14 15 Burcelin, R., Crivelli, V., Dacosta, A., Roy-Tirelli, A. & Thorens, B. Heterogeneous  
15 metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol*  
16 *Metab* **282**, E834-842 (2002).

17 16 Fernandez-Real, J. M. *et al.* CD14 modulates inflammation-driven insulin resistance.  
18 *Diabetes* **60**, 2179-2186 (2011).

19 17 Patsouris, D. *et al.* Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in  
20 obese insulin resistant animals. *Cell Metab* **8**, 301-309 (2008).

21 18 Mossadegh-Keller, N. *et al.* M-CSF instructs myeloid lineage fate in single  
22 haematopoietic stem cells. *Nature* **497**, 239-243 (2013).

23 19 Luche, E. *et al.* Differential Hematopoietic Activity in White Adipose Tissue  
24 Depending on its Localization. *Journal of cellular physiology* **230**, 3076-3083 (2015).

1 20 Cani, P. D. *et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance.  
2 *Diabetes* **56**, 1761-1772 (2007).

3 21 Fujisaka, S. *et al.* Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages  
4 in diet-induced obese mice. *Diabetes* **58**, 2574-2582 (2009).

5 22 Moraes-Vieira, P. M. *et al.* RBP4 activates antigen-presenting cells, leading to adipose  
6 tissue inflammation and systemic insulin resistance. *Cell Metab* **19**, 512-526 (2014).

7 23 Pittet, M. J., Nahrendorf, M. & Swirski, F. K. The journey from stem cell to  
8 macrophage. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1319**, 1-18 (2014).

9 24 Gentek, R., Molawi, K. & Sieweke, M. H. Tissue macrophage identity and self-  
10 renewal. *Immunological reviews* **262**, 56-73 (2014).

11 25 Haldar, M. & Murphy, K. M. Origin, development, and homeostasis of tissue-resident  
12 macrophages. *Immunological reviews* **262**, 25-35 (2014).

13 26 Ginhoux, F. & Guilliams, M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and  
14 Homeostasis. *Immunity* **44**, 439-449 (2016).

15 27 Burcelin, R. *et al.* Impaired glucose homeostasis in mice lacking the alpha1b-  
16 adrenergic receptor subtype. *J Biol Chem* **279**, 1108-1115 (2004).

17 28 Kamohara, S., Burcelin, R., Halaas, J. L., Friedman, J. M. & Charron, M. J. Acute  
18 stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* **389**, 374-377  
19 (1997).

## 21 **ACKNOWLEDGMENTS**

22 The authors thank the US006/CREFRE INSERM/UPS (Toulouse, France) and specifically  
23 the Non-Invasive Exploration service for giving access to the gamma-irradiator BioBeam  
24 8000, and the zootechnical core facility for animal care, the Toulouse RIO Imaging and flow

1 cytometry core facility (Toulouse, France) for cell sorting, C. Evra, V. Marin, A. Pecastaing  
2 P. Guillou, A. Balguerie, and A. Giry for their technical assistance.

3 Our research was supported by a grant from Aviesan/AstraZeneca , « Diabetes and the vessel  
4 wall injury » program, and by a grant from the Société Francophone du Diabète. Rémy  
5 Burcelin is a recipient of grants from the 7th European Framework Program (Florinash), the  
6 Agence Nationale de la Recherche (ANR: Floradip, Transflora, Bactimmunodia). Céline  
7 Pomié is recipient of grants from the Société Francophone du Diabète.

8

#### 9 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

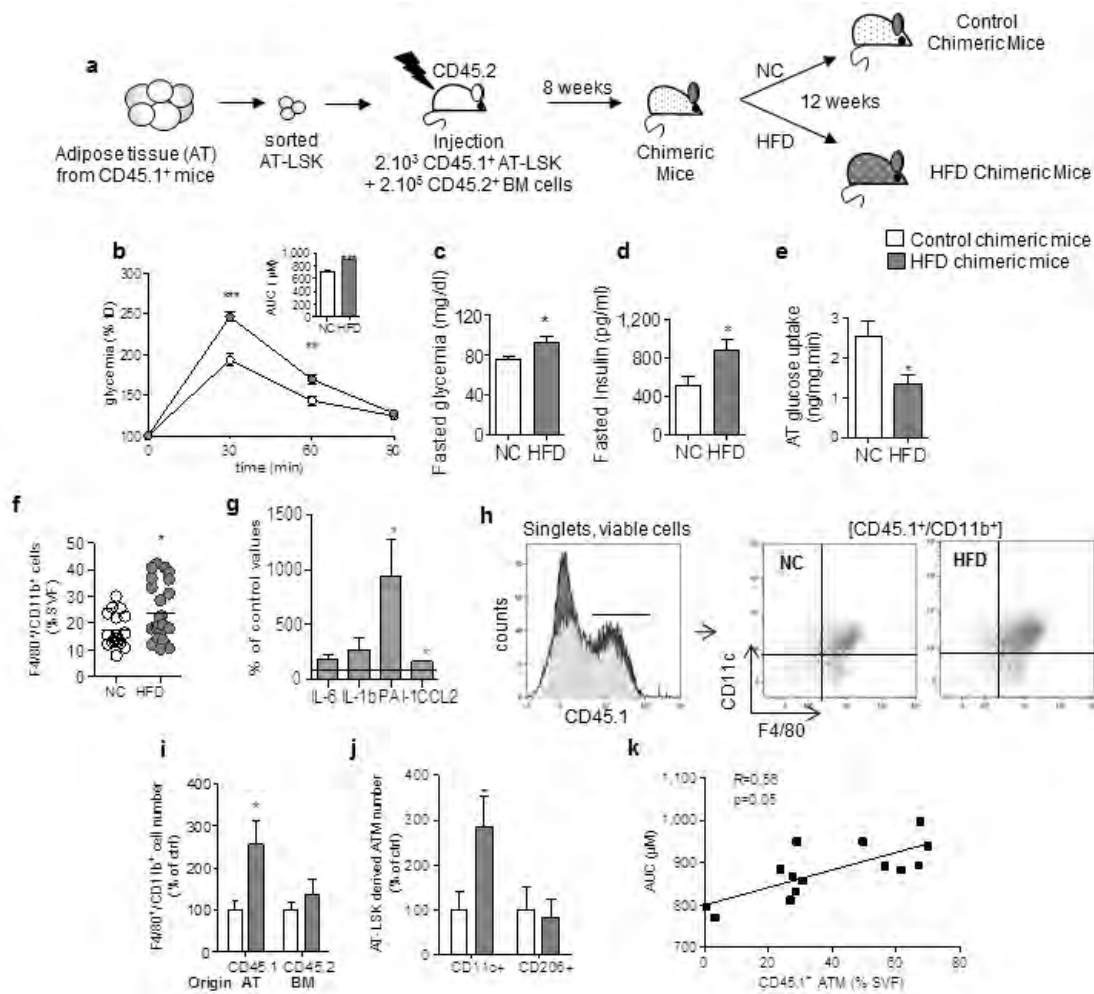
10 EL, LC and BC contributed to the study design. EL, CP, VC and BC conducted the animal  
11 experiments. EL, VC, EA, AV and BC conducted cell sorting experiments and gene  
12 expression analyses. EL CP, VC, EA, AV, EL and BC participated in acquisition of the data.  
13 EL, EA, AV, PL, RB, LC and BC performed data analysis, and contributed to writing of the  
14 manuscript. All authors critically reviewed and approved the manuscript.

15

#### 16 **COMPETING FINANCIAL INTERESTS STATEMENT**

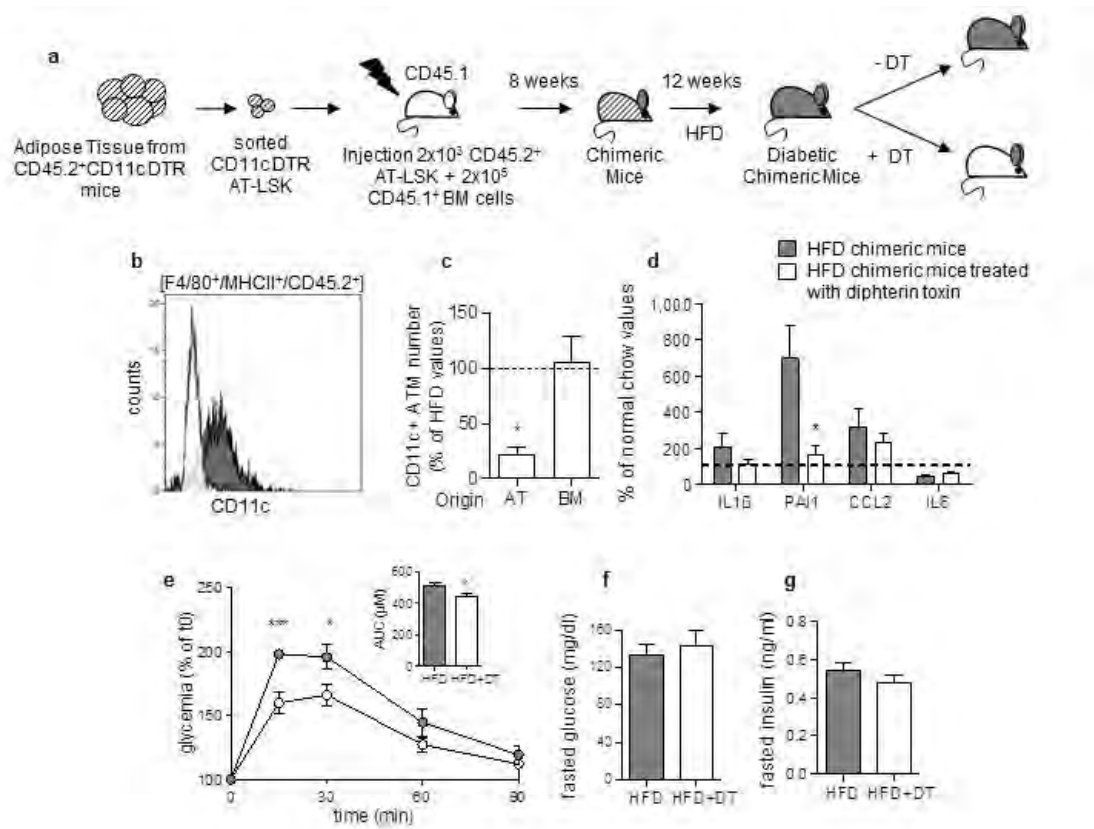
17 The authors have declared that no conflict of interest exists.

18



**Figure 1: Accumulating Adipose Tissue Macrophages (ATM) in HFD-chimeric mice originate from AT-LSK.**

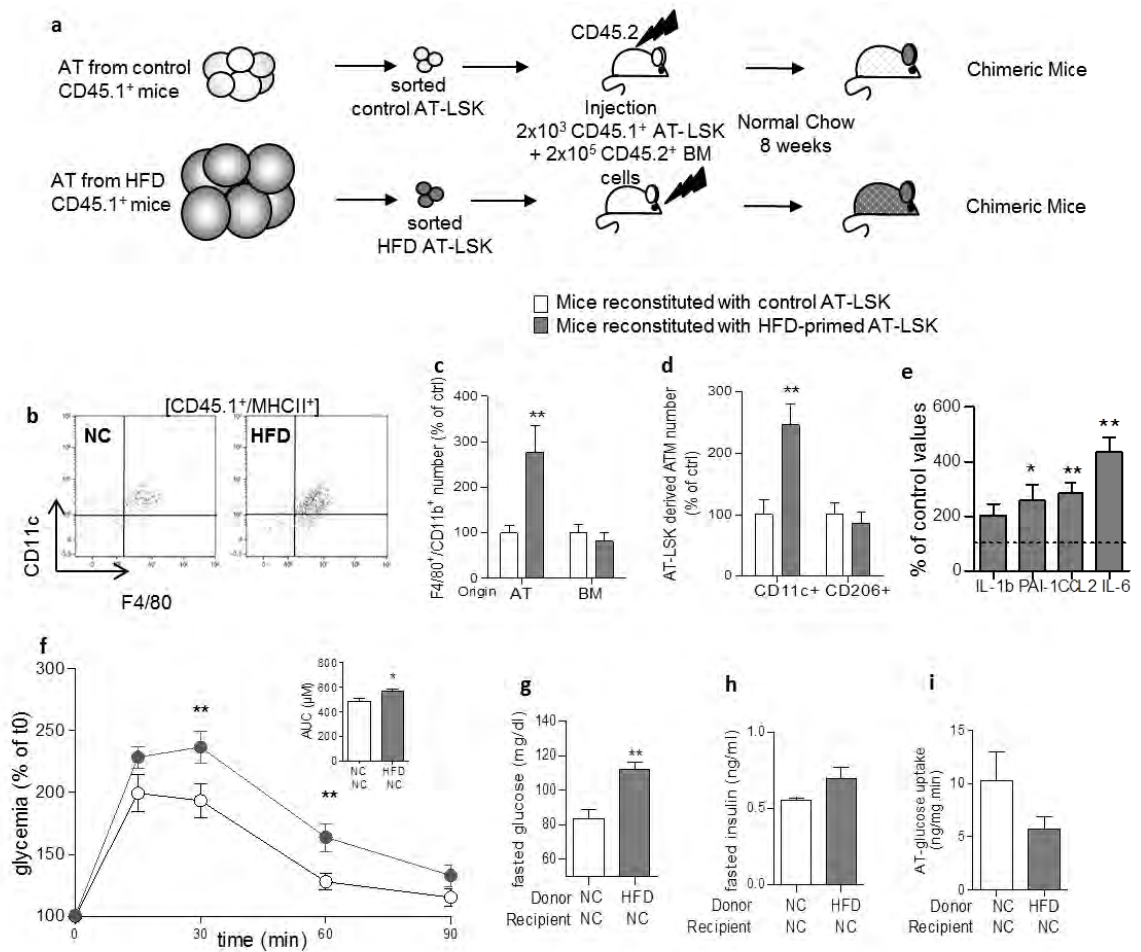
(a) Schematic representation of experimental procedure: lethally irradiated CD45.2<sup>+</sup> recipients mice were co-injected with sorted AT-LSK and total BM cells isolated respectively from CD45.1 and CD45.2 expressing donor mice, and were then fed a normal Chow (NC) or a high fat diet (HFD) for 12 weeks. Metabolic profile was investigated in chimeric mice by IPGTT and AUC (b and insert), quantification of fasted glucose (c) and insulin (d) levels and AT-glucose uptake (ng/mg.min) (e). (f) Total ATM content identified as CD11b<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup> cells was quantified by flow cytometry and expressed in percent of SVF cells. (g) Expression of genes encoding for inflammatory cytokines analyzed by qRT-PCR in the AT and expressed in arbitrary units (AU) as a percent of control values. (h) Flow cytometry was performed on SVF cells from NC or HFD mice to identify CD11c<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> cells in a CD45.1<sup>+</sup> cell population gated on singlet live cells. (i) Quantification of the total ATM (CD11b<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup>) content arising from AT-LSK (AT) or BM. (j) Quantification of AT-LSK-derived pro-inflammatory (CD11b<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup>) and anti-inflammatory ATM populations (CD11b<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>). (k) Correlation between CD45.1<sup>+</sup> ATM content (expressed in % of SVF) and AUC. Results are expressed as mean  $\pm$  sem of 16 to 26 individual animals in control (white symbols) and HFD (grey symbols) groups. Comparisons between groups were made with the unpaired Mann and Whitney. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figure 2: Specific depletion in inflammatory macrophages derived from AT-LSK improves glucose metabolism in HFD mice.**

(a) Schematic representation of experimental procedure: lethally irradiated CD45.1<sup>+</sup> recipient mice were co-injected with sorted AT-LSK and total BM cells isolated respectively from CD45.2<sup>+</sup> CD11c-DTR and CD45.1<sup>+</sup> donor mice, and were then fed a high fat diet (HFD) for 12 weeks, before treatment with diphtheria toxin (DT). (b) Representative histogram showing the number of inflammatory ATM derived from AT-LSK identified as CD45.2<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup>/MHC II<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> cells in HFD untreated (grey histogram) and DT-treated (white histogram) mice. (c) Quantification of CD11c<sup>+</sup> ATM derived from AT-LSK (AT) or BM in HFD mice treated with DT, expressed in percent of HFD untreated mice. (d) Expression of genes encoding for inflammatory cytokines analyzed by qRT-PCR in the AT and expressed in arbitrary units (AU) as a percent of normal chow values (dotted line). (e-g) Metabolic phenotype determined with GTT and AUC (e), fasted glucose (f) and insulin (g) levels. Results are expressed in mean ± sem; n= 5-6 individual animals in HFD untreated (grey symbols) or DT treated (white symbols) groups. \* p<0.05; \*\* p<0.01 in HFD vs HFD DT-treated mice, Mann and Whitney test.

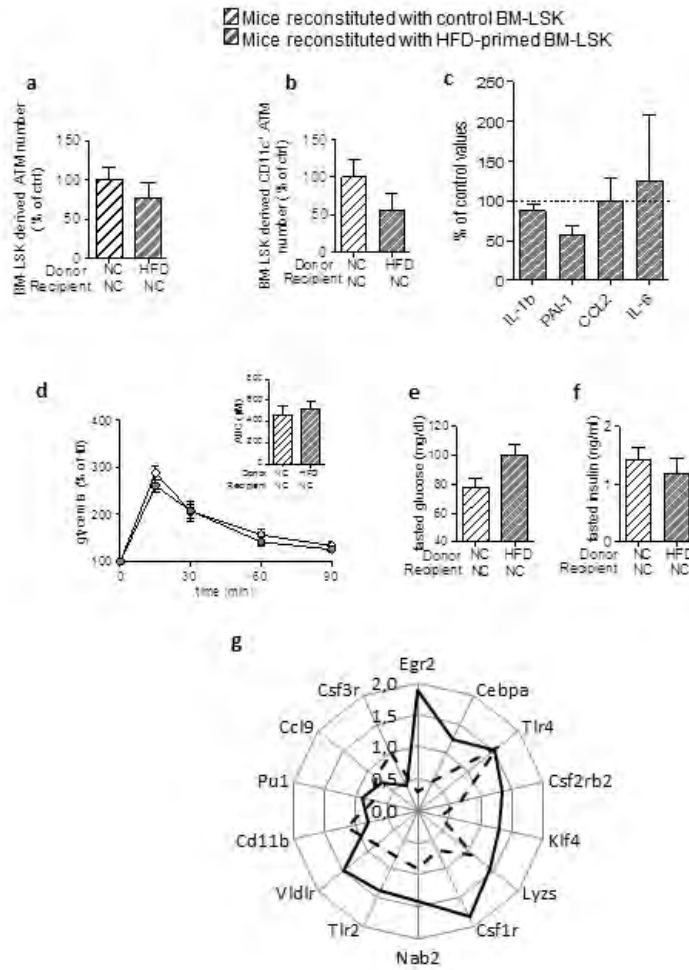




**Figure 3 : Adoptive transfer of metabolic disease with injection of AT-LSK sorted from HFD mice.**

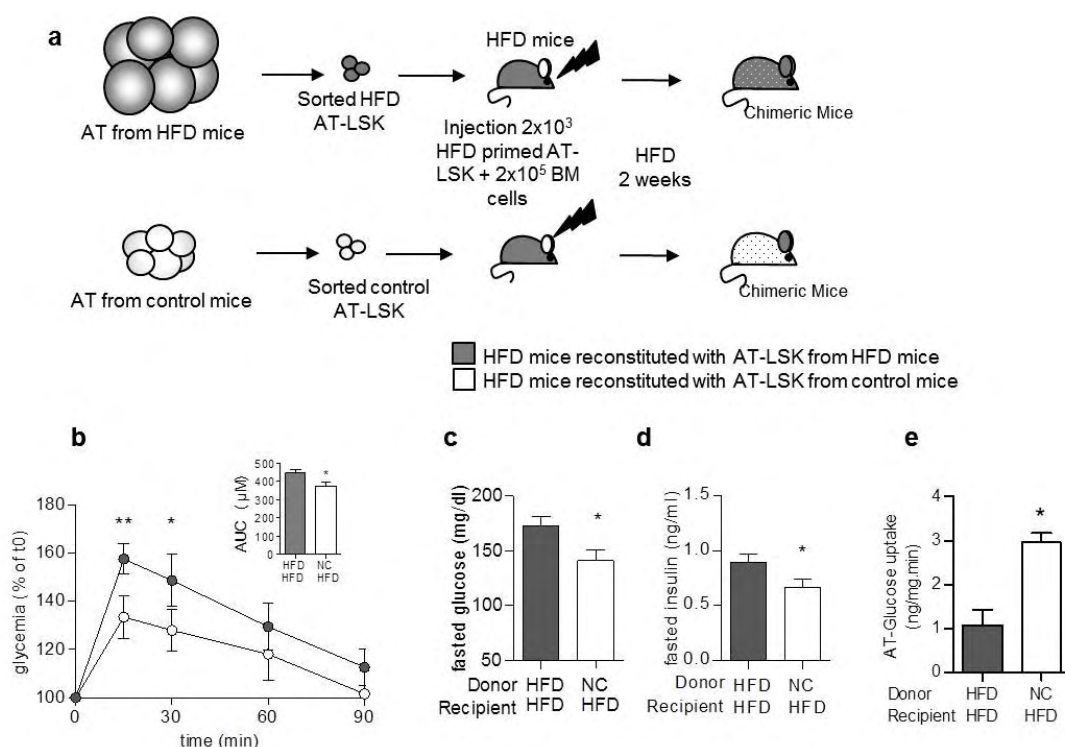
(a) Schematic representation of experimental procedure: lethally irradiated CD45.2<sup>+</sup> recipient mice were co-injected with sorted AT-LSK isolated from control or HFD CD45.1<sup>+</sup> donor mice and total BM cells isolated from control CD45.2<sup>+</sup> mice. Chimeric mice were then maintained on normal chow for 8 weeks. (b) Representative dot plots showing ATM identified as CD11c<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> cells in a CD45.1<sup>+</sup> cell population gated on singlet live cells. The number of total ATM derived from AT-LSK (AT) or BM (c), CD11c<sup>+</sup> and CD206<sup>+</sup> ATM derived from AT-LSK (d) was determined and expressed in percent of control values. (e) Expression of genes encoding for inflammatory cytokines analyzed by qRT-PCR in the AT and expressed in arbitrary units (AU) as a percent of values obtained in mice reconstituted with control AT-LSK (dotted line). (f-i) Metabolic phenotype was determined with GTT and AUC (f), fasted glucose (g) and insulin (h) levels and AT-glucose uptake (i). Results are expressed in mean ± sem; n= 5 to 8 individual mice transplanted with AT-LSK sorted from either control (white symbols) or HFD (grey symbols) mice. \* p<0.05, \*\* p<0.01; Mann and Whitney test.





## Figure 4 : Specificity of AT- vs BM-LSK in induction of metabolic disease

Competitive repopulation assay was performed as in Figure 1 but recipient mice were transplanted with BM-LSK sorted from control or HFD mice. Quantification of Total ATM (a) and CD11c<sup>+</sup> ATM (b) populations derived from BM-LSK. (c) Expression of genes encoding for inflammatory cytokines analyzed by qRT-PCR in the AT and expressed as a percent of control values obtained in mice reconstituted with control BM-LSK. (d-f) Metabolic phenotype determined with GTT and AUC (d), fasted glucose (e) and insulin (f) levels. Results are expressed in mean  $\pm$  sem; n= 7 individual animals transplanted with BM-LSK sorted from either control (hatched white bars) or HFD (hatched grey bars) mice. (g) Radar chart showing the relative enrichment of the expression of transcription factors and cytokines/chemokine receptors involved in myeloid commitment measured by qRT-PCR in AT-LSK (solid line) and BM-LSK (dotted line) sorted from HFD versus control mice. The ratio between HFD and control of values of 4 independent samples are plotted on the graph. Cebpa : CCAAT Enhancer Binding Protein alpha; TLR4: Toll Like Receptor 4; Csf2rb2: Colony Stimulating Factor 2 Receptor Beta 2; Klf4: Kruppel-Like Factor 4; Lyzs: Lysozyme; Csf1r: Colony Stimulating Factor 1 Receptor; Nab2 : NGFI-A Binding Protein 2; Tlr2: Toll Like Receptor 2; Vldlr: Very-Low-Density-Lipoprotein Receptor; Ccl9: Chemokine (C-C motif) Ligand 9; Csf3r: Colony Stimulating Factor 3 Receptor; Egr2: Early Growth Response 2.



**Figure 5: Therapeutic effect of AT-LSK transplantation in HFD mice.**

(a) Schematic representation of experimental procedure: HFD lethally irradiated CD45.2<sup>+</sup> recipients mice were co-injected with sorted AT-LSK isolated from HFD or control CD45.1<sup>+</sup> donor mice and total BM cells from NC CD45.2<sup>+</sup> mice, and maintained on HFD for 2 weeks. (b-e) Metabolic phenotype was determined with GTT and AUC (b), fasted glucose (c) and insulin (d) levels and (e) AT-glucose uptake. Results are expressed in mean  $\pm$  sem; n=13-15 individual animals transplanted with AT-LSK sorted from either HFD (grey symbols) or control (white symbols) mice. \* p<0.05, \*\*p<0.01; Mann and Whitney test.

## Curriculum Vitae

Née le 02/10/1988 à Mont de Marsan

### **Titres et diplômes :**

- 2006-2008 : Première année de Médecine, Université de Limoges (87) France
- 2010 : Licence 3 Biologie Cellulaire et Physiologie mention AB; moy : 13,8/20 ; Rang : 13/174, Université de Limoges, France
- 2011 : Master 1 Biologie Santé mention AB; moy : 13,25/20 ; rang 28/197, Université Paul Sabatier, Toulouse.
- 2012 : Master 2 Physiopathologie des maladies cardiovasculaires et métaboliques mention B; moy : 14,75/20 ; rang 5/19, Université Paul Sabatier, Toulouse.
- 2012 : Contrat doctoral sur concours de l'école doctorale Biologie Santé Biotechnologie de Toulouse
- 2013-2015 : Doctorant chargé d'enseignement (DCE) en neurosciences, Université Paul Sabatier, Toulouse.
- 2015-2016 : Attaché d'Enseignement et de Recherche (ATER) en biologie cellulaire, Université Paul Sabatier, Toulouse

### **Parcours professionnel dans la recherche :**

#### **- Travail en laboratoire :**

*Janvier 2011 à Juin 2011* (temps partiel): Stage Master 1,  
Laboratoire : STROMALab, UMR 5273 CNRS/UPS/EFS, U1031 INSERM,  
Equipe : Plasticité des tissus adipeux.  
Sujet : Contrôle des cellules souches du tissu adipeux par le neuropeptide Y, étude *in vitro*.  
Encadrantes: Anne Lorisgnol et Cécile Dromard Berthézène

*Juillet 2011 à Juin 2012* (temps partiel): Stage Master 2,  
Laboratoire : STROMALab, UMR 5273 CNRS/UPS/EFS, U1031 INSERM,  
Equipe : Plasticité des tissus adipeux.  
Employeur : CNRS.  
Sujet : Contrôle des cellules souches du tissu adipeux par le neuropeptide Y: rôle dans l'homéostasie tissulaire ?  
Encadrantes : Anne Lorisgnol et Cécile Dromard Berthézène

*Octobre 2012 – Aout 2016* (temps complet) : Thèse en physiopathologies  
Laboratoire : STROMALab, UMR 5273 CNRS/UPS/EFS, U1031 INSERM,  
Equipe : Plasticité des tissus adipeux.  
Sujet : La régénération chez le mammifère : implication de l'innervation et du système immunitaire.  
Directeur de thèse: Anne Lorisgnol et Cécile Dromard Berthezene  
Employeur : Université Paul Sabatier, Toulouse

#### **- Enseignement / encadrement:**

*2010-2011* (temps partiel) : Tutrice universitaire pour les étudiants de L1, Employeur : Université de Limoges

*Octobre 2013 - Octobre 2015* (128h) : Doctorante chargé d'enseignement en Neurosciences.  
Préparation de Cours, TD, TP, corrections de copies.  
Employeur : Université Paul Sabatier, Toulouse



2012- 2015 : Encadrement d'étudiants : M1 (3 étudiants), Licence 2 (1 étudiante), ENS Lyon (1 étudiante), 2<sup>ème</sup> année de médecine (1 étudiante)  
2015-2016 (112h) : Attaché d'Enseignement et de Recherche en Biologie Cellulaire  
Employeur Université Paul Sabatier, Toulouse

- Participation à des congrès scientifiques:

Octobre 2012 – Mai 2013 : préparation du congrès « Les journées de l'école doctorale Biologie Santé Biotechnologie » : choix des conférenciers, organisation des trois journées, demandes de financements

6-10 septembre 2014 : Présentation affichée au congrès « The molecular and cellular basis of regeneration and tissue repair ». EMBO. Saint Feliu de Guixols, Espagne.

14-16 janvier 2015 : Présentation affichée au congrès AFERO Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité. Nantes, France.

13-17 septembre 2015 : Présentation affichée au congrès « Building, repairing and evolving biological tissues ». Jacques Monod Conference. Roscoff, France.

10-14 janvier 2016 : Présentation affichée au congrès "Molecular and cellular basis of growth and regeneration". Keystone Symposia. Breckenridge. USA

- Vulgarisation scientifique :

26 septembre 2014 : participation à la 9<sup>ème</sup> édition de la Nuit des Chercheurs, organisation et participation au « speed searching », Cité de l'Espace, Toulouse.

1<sup>er</sup> février 2015 : organisation et participation au Kiosque Actus « Vieillissement naturel ou perpétuelle jeunesse », Muséum d'Histoires Naturelles, Toulouse.

2014-2015 : Membre de l'association « Les étoiles brillent pour tous » et préparation d'ateliers sur la thématique « Vision et Images » qui seront présentés dans les maisons de retraite, prisons, école de la deuxième chance.

25 septembre 2015 : mise en place et participation de l'atelier « viens toi-même isoler les cellules souches » au « Coin des mini-chercheurs » de la 10<sup>ème</sup> édition de la Nuit des Chercheurs, Cité de l'Espace, Toulouse.  
Participation au « speed searching ».



# BIBLIOGRAPHIE

---

- 1 Cinti, S. The adipose organ at a glance. *Disease models & mechanisms* **5**, 588-594, doi:10.1242/dmm.009662 (2012).
- 2 Mizuno, H., Tobita, M. & Uysal, C. A. Concise review: adipose derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem cells* **30**, 804-810, doi:10.1002/stem.1076 (2012).
- 3 Rodbell, M. Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. *J Biol Chem* **239**, 375-380 (1964).
- 4 Proença, A. R. *et al.* New concepts in white adipose tissue physiology. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]* **47**, 192-205, doi:10.1590/1414-431X20132911 (2014).
- 5 Zhang, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425-432, doi:10.1038/372425a0 (1994).
- 6 Trayhurn, P. Adipocyte biology. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* **8 Suppl 1**, 41-44, doi:10.1111/j.1467-789X.2007.00316.x (2007).
- 7 Catteau, A. *et al.* Leptin and its potential interest in assisted reproduction cycles. *Human reproduction update*, doi:10.1093/humupd/dmv057 (2015).
- 8 Naylor, C. & Petri, W. A. Leptin Regulation of Immune Responses. *Trends in molecular medicine* **22**, 88-98, doi:10.1016/j.molmed.2015.12.001 (2016).
- 9 Chen, X. X. & Yang, T. Roles of leptin in bone metabolism and bone diseases. *Journal of bone and mineral metabolism* **33**, 474-485, doi:10.1007/s00774-014-0569-7 (2015).
- 10 Rajala, M. W. & Scherer, P. E. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* **144**, 3765-3773, doi:10.1210/en.2003-0580 (2003).
- 11 Ricquier, D. & Bouillaud, F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *The Biochemical journal* **345 Pt 2**, 161-179 (2000).
- 12 Ricquier, D. Uncoupling protein 1 of brown adipocytes, the only uncoupler: a historical perspective. *Frontiers in endocrinology* **2** (2011).
- 13 Hondares, E. *et al.* Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem* **286**, 12983-12990, doi:10.1074/jbc.M110.215889 (2011).
- 14 Villarroya, J., Cereijo, R. & Villarroya, F. An endocrine role for brown adipose tissue? *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **305**, 72, doi:10.1152/ajpendo.00250.2013 (2013).
- 15 Xue, B., Coulter, A., Rim, J. S., Koza, R. A. & Kozak, L. P. Transcriptional synergy and the regulation of Ucp1 during brown adipocyte induction in white fat depots. *Molecular and cellular biology* **25**, 8311-8322, doi:10.1128/MCB.25.18.8311-8322.2005 (2005).
- 16 Waldén, T. B., Hansen, I. R., Timmons, J. A., Cannon, B. & Nedergaard, J. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **302**, 31, doi:10.1152/ajpendo.00249.2011 (2012).
- 17 Cousin, B. *et al.* Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *Journal of cell science* **103 ( Pt 4)**, 931-942 (1992).



- 18 Vegiopoulos, A., Müller-Decker, K., Strzoda, D. & Schmitt, I. Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science* (2010).
- 19 Rosenwald, M., Perdikari, A., Rülcke, T. & Wolfrum, C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nature cell biology* **15**, 659-667, doi:10.1038/ncb2740 (2013).
- 20 Arner, E. *et al.* Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes* **59**, 105-109, doi:10.2337/db09-0942 (2010).
- 21 Ailhaud, G., Grimaldi, P. & Negrel, R. A molecular view of adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* **16 Suppl 2**, S17-21 (1992).
- 22 Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P. & Spiegelman, B. M. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes & development* **14**, 1293-1307 (2000).
- 23 Rosen, E. D. & MacDougald, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 885-896, doi:10.1038/nrm2066 (2006).
- 24 Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, doi:10.1080/14653240600855905 (2006).
- 25 Friedenstein, A. J. *et al.* Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* **2**, 83-92 (1974).
- 26 Horwitz, E. M., Blanc, L. K., Dominici, M. & Mueller, I. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. ..., doi:10.1080/14653240500319234 (2005).
- 27 Casteilla, L., Planat-Benard, V., Laharrague, P. & Cousin, B. Adipose-derived stromal cells: Their identity and uses in clinical trials, an update. *World journal of stem cells* **3**, 25-33, doi:10.4252/wjsc.v3.i4.25 (2011).
- 28 Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* **8**, 726-736, doi:10.1038/nri2395 (2008).
- 29 Billon, N. *et al.* The generation of adipocytes by the neural crest. *Development* **134**, 2283-2292 (2007).
- 30 Rodeheffer, M. S., Birsoy, K. & Friedman, J. M. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell* **135**, 240-249, doi:10.1016/j.cell.2008.09.036 (2008).
- 31 Tang, W. *et al.* White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* **322**, 583-586, doi:10.1126/science.1156232 (2008).
- 32 Gupta, R. K., Mepani, R. J., Kleiner, S., Lo, J. C. & Khandekar, M. J. Zfp423 expression identifies committed preadipocytes and localizes to adipose endothelial and perivascular cells. *Cell metabolism* (2012).
- 33 Maumus, M. *et al.* Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *International journal of obesity (2005)* **35**, 1141-1153, doi:10.1038/ijo.2010.269 (2011).
- 34 Lin, Y. F. *et al.* Identification of osteo-adipo progenitor cells in fat tissue. *Cell proliferation* **41**, 803-812, doi:10.1111/j.1365-2184.2008.00542.x (2008).
- 35 Lin, C. S. *et al.* Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol Histopathol* **25**, 807-815 (2010).
- 36 Crossno, J. T., Majka, S. M., Grazia, T., Gill, R. G. & Klemm, D. J. Rosiglitazone promotes development of a novel adipocyte population from bone marrow-derived circulating progenitor cells. *The Journal of clinical investigation* **116**, 3220-3228, doi:10.1172/JCI28510 (2006).

- 37 Berry, R. & Rodeheffer, M. S. Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo. *Nature cell biology* **15**, 302-308, doi:10.1038/ncb2696 (2013).
- 38 Ohno, H., Shinoda, K., Spiegelman, B. M. & Kajimura, S. PPAR $\gamma$  agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell metabolism* **15**, 395-404, doi:10.1016/j.cmet.2012.01.019 (2012).
- 39 Townsend, K. L. & Tseng, Y.-H. H. Brown fat fuel utilization and thermogenesis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **25**, 168-177, doi:10.1016/j.tem.2013.12.004 (2014).
- 40 Rosen, E. D. & Spiegelman, B. M. What we talk about when we talk about fat. *Cell* **156**, 20-44, doi:10.1016/j.cell.2013.12.012 (2014).
- 41 Sanchez-Gurmaches, J. & Guertin, D. A. Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nature communications* **5**, 4099, doi:10.1038/ncomms5099 (2014).
- 42 Fisher, F. M. *et al.* FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes & development* **26**, 271-281, doi:10.1101/gad.177857.111 (2012).
- 43 Okla, M., Ha, J.-H. H., Temel, R. E. & Chung, S. BMP7 drives human adipogenic stem cells into metabolically active beige adipocytes. *Lipids* **50**, 111-120, doi:10.1007/s11745-014-3981-9 (2015).
- 44 Peirce, V., Carobbio, S. & Vidal-Puig, A. The different shades of fat. *Nature* **510**, 76-83, doi:10.1038/nature13477 (2014).
- 45 Saverio, C. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* **297**, doi:10.1152/ajpendo.00183.2009 (2009).
- 46 Lee, Y.-H. H., Petkova, A. P., Konkar, A. A. & Granneman, J. G. Cellular origins of cold-induced brown adipocytes in adult mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **29**, 286-299, doi:10.1096/fj.14-263038 (2015).
- 47 Lee, Y. H., Petkova, A. P., Mottillo, E. P. & Granneman, J. G. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by  $\beta$ 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell metabolism* (2012).
- 48 Wu, J. *et al.* Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* (2012).
- 49 Hotamisligil, G. S. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**, 860-867, doi:10.1038/nature05485 (2006).
- 50 Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J. & Walsh, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews. Immunology* **11**, 85-97, doi:10.1038/nri2921 (2011).
- 51 Lee, Y.-H. H., Thacker, R. I., Hall, B. E., Kong, R. & Granneman, J. G. Exploring the activated adipogenic niche: interactions of macrophages and adipocyte progenitors. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **13**, 184-190, doi:10.4161/cc.27647 (2014).
- 52 Madsen, L. *et al.* UCP1 induction during recruitment of brown adipocytes in white adipose tissue is dependent on cyclooxygenase activity. *PloS one* **5**, doi:10.1371/journal.pone.0011391 (2010).
- 53 Nguyen, K. D. *et al.* Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* **480**, 104-108, doi:10.1038/nature10653 (2011).

- 54 Lee, M.-W. W. *et al.* Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell* **160**, 74-87, doi:10.1016/j.cell.2014.12.011 (2015).
- 55 Han, J. *et al.* Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **115**, 957-964, doi:10.1182/blood-2009-05-219923 (2010).
- 56 Cousin, B., André, M., Arnaud, E., Pénicaud, L. & Casteilla, L. Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue. *Biochemical and biophysical research communications* **301**, 1016-1022 (2003).
- 57 Poglio, S. *et al.* In situ production of innate immune cells in murine white adipose tissue. *Blood* **120**, 4952-4962, doi:10.1182/blood-2012-01-406959 (2012).
- 58 Tran, T. T., Yamamoto, Y., Gesta, S. & Kahn, C. R. Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell metabolism* **7**, 410-420, doi:10.1016/j.cmet.2008.04.004 (2008).
- 59 Gesta, S. *et al.* Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 6676-6681, doi:10.1073/pnas.0601752103 (2006).
- 60 Tchkonja, T. *et al.* Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **292**, 307, doi:10.1152/ajpendo.00202.2006 (2007).
- 61 Vohl, M.-C. C. *et al.* A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obesity research* **12**, 1217-1222, doi:10.1038/oby.2004.153 (2004).
- 62 Karelis, A. D., St-Pierre, D. H., Conus, F., Rabasa-Lhoret, R. & Poehlman, E. T. Metabolic and body composition factors in subgroups of obesity: what do we know? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **89**, 2569-2575, doi:10.1210/jc.2004-0165 (2004).
- 63 Lean, M. E. Brown adipose tissue in humans. *The Proceedings of the Nutrition Society* **48**, 243-256 (1989).
- 64 Heaton, J. M. The distribution of brown adipose tissue in the human. *J Anat* **112**, 35-39 (1972).
- 65 Nedergaard, J., Bengtsson, T. & Cannon, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **293**, 52, doi:10.1152/ajpendo.00691.2006 (2007).
- 66 Virtanen, K. A. *et al.* Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* **360**, 1518-1525, doi:10.1056/NEJMoa0808949 (2009).
- 67 Divoux, A. & Clément, K. Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* **12**, 503, doi:10.1111/j.1467-789X.2010.00811.x (2011).
- 68 Sun, K., Tordjman, J., Clément, K. & Scherer, P. E. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell metabolism* **18**, 470-477, doi:10.1016/j.cmet.2013.06.016 (2013).
- 69 Nnodim, J. O. Development of adipose tissues. *The Anatomical record* **219**, 331-337, doi:10.1002/ar.1092190402 (1987).
- 70 Giordano, A., Song, C. K. & Bowers, R. R. White adipose tissue lacks significant vagal innervation and immunohistochemical evidence of parasympathetic innervation. *American Journal of ...* (2006).

- 71 Cantu, R. C. & Goodman, H. M. Effects of denervation and fasting on white adipose tissue. *Am J Physiol* **212**, 207-212 (1967).
- 72 Mauriege, P., Pergola, D. G., Berlan, M. & Lafontan, M. Human fat cell beta-adrenergic receptors: beta-agonist-dependent lipolytic responses and characterization of beta-adrenergic binding sites on human fat cell .... *Journal of lipid research* (1988).
- 73 Zeng, W. *et al.* Sympathetic Neuro-adipose Connections Mediate Leptin-Driven Lipolysis. *Cell* **163**, 84-94, doi:10.1016/j.cell.2015.08.055 (2015).
- 74 Pénicaud, L. & Lorsignol, A. Dialogue entre tissus adipeux blancs et cerveau. doi:10.1007/978-2-8178-0332-6\_12.
- 75 Foster, M. T. & Bartness, T. J. Sympathetic but not sensory denervation stimulates white adipocyte proliferation. *{Foster, 2006 #157}* **291**, R1630-1637, doi:10.1152/ajpregu.00197.2006 (2006).
- 76 Jones, D. D., Ramsay, T. G., Hausman, G. J. & Martin, R. J. Norepinephrine inhibits rat pre-adipocyte proliferation. *Int J Obes Relat Metab Disord* **16**, 349-354 (1992).
- 77 Cousin, B. *et al.* Local sympathetic denervation of white adipose tissue in rats induces preadipocyte proliferation without noticeable changes in metabolism. *Endocrinology* **133**, 2255-2262, doi:10.1210/endo.133.5.8404678 (1993).
- 78 Yang, K., Guan, H., Arany, E., Hill, D. J. & Cao, X. Neuropeptide Y is produced in visceral adipose tissue and promotes proliferation of adipocyte precursor cells via the Y1 receptor. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **22**, 2452-2464, doi:10.1096/fj.07-100735 (2008).
- 79 Marshall, J. M. The influence of the sympathetic nervous system on individual vessels of the microcirculation of skeletal muscle of the rat. *The Journal of physiology*, doi:10.1113/jphysiol.1982.sp014408 (1982).
- 80 Intaglietta, M. & Rosell, S. Capillary permeability and sympathetic activity in canine subcutaneous adipose tissue. *Capillary permeability and sympathetic activity in canine subcutaneous adipose tissue*, doi:10.1038/249481a0 (1974).
- 81 Shi, H., Bowers, R. R. & Bartness, T. J. Norepinephrine turnover in brown and white adipose tissue after partial lipectomy. *Physiology & behavior* **81**, 535-542, doi:10.1016/j.physbeh.2004.02.023 (2004).
- 82 Nijima, A. Afferent signals from leptin sensors in the white adipose tissue of the epididymis, and their reflex effect in the rat. *J Auton Nerv Syst* **73**, 19-25 (1998).
- 83 Nijima, A. Reflex effects from leptin sensors in the white adipose tissue of the epididymis to the efferent activity of the sympathetic and vagus nerve in the rat. *Neurosci Lett* **262**, 125-128 (1999).
- 84 Xiong, X. Q., Chen, W. W. & Zhu, G. Q. Adipose afferent reflex: sympathetic activation and obesity hypertension. *Acta Physiologica*, doi:10.1111/apha.12182 (2014).
- 85 Bargmann, W., Hehn, G. & Lindner, E. Über die Zellen des braunen Fettgewebes und ihre Innervation. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* **85**, 601-613, doi:10.1007/BF00324749 (1968).
- 86 Bartness, T. J., Vaughan, C. H. & Song, C. K. Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *International journal of obesity (2005)* **34 Suppl 1**, 42, doi:10.1038/ijo.2010.182 (2010).
- 87 Uldry, M. *et al.* Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell metabolism* **3**, 333-341, doi:10.1016/j.cmet.2006.04.002 (2006).

- 88 Ricquier, D. *et al.* Expression of uncoupling protein mRNA in thermogenic or weakly thermogenic brown adipose tissue. Evidence for a rapid beta-adrenoreceptor-mediated and transcriptionally regulated step during activation of thermogenesis. *The Journal of biological chemistry* **261**, 13905-13910 (1986).
- 89 Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological reviews* **84**, 277-359, doi:10.1152/physrev.00015.2003 (2004).
- 90 Ricquier, D. & Bouillaud, F. The mitochondrial uncoupling protein: structural and genetic studies. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **56**, 83-108 (1997).
- 91 Oberkofler, H., Schraml, E., Krempler, F. & Patsch, W. Potentiation of liver X receptor transcriptional activity by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha. *The Biochemical journal* **371**, 89-96, doi:10.1042/BJ20021665 (2003).
- 92 Bronnikov, G. *et al.* beta1 to beta3 switch in control of cyclic adenosine monophosphate during brown adipocyte development explains distinct beta-adrenoceptor subtype mediation of proliferation and differentiation. *Endocrinology* **140**, 4185-4197, doi:10.1210/endo.140.9.6972 (1999).
- 93 Giordano, A., Frontini, A., Castellucci, M. & Cinti, S. Presence and distribution of cholinergic nerves in rat mediastinal brown adipose tissue. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **52**, 923-930, doi:10.1369/jhc.3A6246.2004 (2004).
- 94 Norman, D., Mukherjee, S., Symons, D., Jung, R. T. & Lever, J. D. Neuropeptides in interscapular and perirenal brown adipose tissue in the rat: a plurality of innervation. *J Neurocytol* **17**, 305-311 (1988).
- 95 Lever, J. D., Mukherjee, S., Norman, D., Symons, D. & Jung, R. T. Neuropeptide and noradrenaline distributions in rat interscapular brown fat and in its intact and obstructed nerves of supply. *J Auton Nerv Syst* **25**, 15-25 (1988).
- 96 Cao, Y. Angiogenesis and vascular functions in modulation of obesity, adipose metabolism, and insulin sensitivity. *Cell metabolism* **18**, 478-489, doi:10.1016/j.cmet.2013.08.008 (2013).
- 97 Shimizu, I. *et al.* Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *The Journal of clinical investigation* **124**, 2099-2112, doi:10.1172/JCI71643 (2014).
- 98 Wassermann, F. The development of adipose tissue. *Handbook of Physiology*.
- 99 Crandall, D. L., Hausman, G. J. & Kral, J. G. A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)* **4**, 211-232 (1997).
- 100 Han, J. *et al.* The spatiotemporal development of adipose tissue. *Development (Cambridge, England)* **138**, 5027-5037, doi:10.1242/dev.067686 (2011).
- 101 Khan, T. *et al.* Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Molecular and cellular biology* **29**, 1575-1591, doi:10.1128/MCB.01300-08 (2009).
- 102 Fukumura, D. *et al.* Paracrine regulation of angiogenesis and adipocyte differentiation during in vivo adipogenesis. *Circulation research* **93**, 97, doi:10.1161/01.RES.0000099243.20096.FA (2003).
- 103 Bråkenhielm, E. *et al.* Angiogenesis inhibitor, TNP-470, prevents diet-induced and genetic obesity in mice. *Circulation research* **94**, 1579-1588, doi:10.1161/01.RES.0000132745.76882.70 (2004).

- 104 Rupnick, M. A. *et al.* Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 10730-10735, doi:10.1073/pnas.162349799 (2002).
- 105 Rupnick, M. A. *et al.* Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 10730-10735, doi:10.1073/pnas.162349799 (2002).
- 106 Miranville, A. *et al.* Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* **110**, 349-355, doi:10.1161/01.CIR.0000135466.16823.D0 (2004).
- 107 Evans, W. J. *et al.* Cachexia: a new definition. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* **27**, 793-799, doi:10.1016/j.clnu.2008.06.013 (2008).
- 108 Tsoli, M. *et al.* Activation of thermogenesis in brown adipose tissue and dysregulated lipid metabolism associated with cancer cachexia in mice. *Cancer research* **72**, 4372-4382, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3536 (2012).
- 109 Petruzzelli, M. *et al.* A switch from white to brown fat increases energy expenditure in cancer-associated cachexia. *Cell metabolism* **20**, 433-447, doi:10.1016/j.cmet.2014.06.011 (2014).
- 110 Jeanson, Y., Carrière, A. & Casteilla, L. A New Role for Browning as a Redox and Stress Adaptive Mechanism? *Frontiers in endocrinology* **6**, 158, doi:10.3389/fendo.2015.00158 (2015).
- 111 Hernandez, T. L. *et al.* Fat redistribution following suction lipectomy: defense of body fat and patterns of restoration. *Obesity* **19**, 1388-1395, doi:10.1038/oby.2011.64 (2011).
- 112 G. M. Higgins, R. M. A. Experimental pathology of the liver – Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* **12**, 186-202 (1931).
- 113 Mauer, M., Harris, R. B. S. & Bartness, T. J. The regulation of total body fat: lessons learned from lipectomy studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **25**, 15-28 (2001).
- 114 Reyne, Y., Nougues, J. & Vezinhet, A. Adipose tissue regeneration in 6-month-old and adult rabbits following lipectomy. *Proc Soc Exp Biol Med* **174**, 258-264 (1983).
- 115 Faust, I. M., Johnson, P. R. & Hirsch, J. Adipose tissue regeneration following lipectomy. *Science* **197**, 391-393 (1977).
- 116 Simorre, M. *et al.* Transfert de tissu adipeux en reconstruction mammaire : y a-t-il des populations à risque ? Revue systématique de la littérature. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* **43**, 309-318, doi:10.1016/j.gyobfe.2015.02.003 (2015).
- 117 Coleman, S. R. Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic plastic surgery*, doi:10.1007/BF00453875 (1995).
- 118 Delay, E. M. M. T. G. H. Q. C., Garson S, Sinna R. Apport des transferts graisseux en reconstrution mammaire. *Encycl Méd Chir Techn Chir - Chir Plast Reconstr Esthét* **45-665D**, doi:10.1016/S1286-9325(11)43652-9 (2011).
- 119 Veber, M. *et al.* Radiographic findings after breast augmentation by autologous fat transfer. *Plast Reconstr Surg* **127**, 1289-1299, doi:10.1097/PRS.0b013e318205f38f (2011).
- 120 Bely, A. E. & Nyberg, K. G. Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. *Trends in ecology & evolution* **25**, 161-170, doi:10.1016/j.tree.2009.08.005 (2010).

- 121 Jerome, G. Getting to mammalian wound repair and amphibian limb regeneration: a mechanistic link in the early events. *Wound Repair and Regeneration* **4**, 190-202, doi:10.1046/j.1524-475X.1996.40205.x (1996).
- 122 David, L. S. Tissue restoration: approaches and prospects. *Wound Repair and Regeneration* **4**, 3-15, doi:10.1046/j.1524-475X.1996.40104.x (1996).
- 123 Davie, E. W. & Ratnoff, O. D. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science* **145**, 1310-1312 (1964).
- 124 Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. & Longaker, M. T. Wound repair and regeneration. *Nature* **453**, 314-321, doi:10.1038/nature07039 (2008).
- 125 Burmester G, P. A. Système immunitaire. *Atlas de poche d'immunologie : Bases, analyse biologiques, pathologies* **2**, 1.
- 126 Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews* **82**, 47-95, doi:10.1152/physrev.00018.2001 (2002).
- 127 Werner, S. & Grose, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* **83**, 835-870, doi:10.1152/physrev.00031.2002 (2003).
- 128 Lin, Z.-Q. Q., Kondo, T., Ishida, Y., Takayasu, T. & Mukaida, N. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *Journal of leukocyte biology* **73**, 713-721 (2003).
- 129 Murray, P. J. & Wynn, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews. Immunology* **11**, 723-737, doi:10.1038/nri3073 (2011).
- 130 Galiano, R. D. *et al.* Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am J Pathol* **164**, 1935-1947, doi:10.1016/S0002-9440(10)63754-6 (2004).
- 131 Pilling, D., Fan, T., Huang, D., Kaul, B. & Gomer, R. H. Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PloS one* **4**, doi:10.1371/journal.pone.0007475 (2009).
- 132 Opalenik, S. R. & Davidson, J. M. Fibroblast differentiation of bone marrow-derived cells during wound repair. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **19**, 1561-1563, doi:10.1096/fj.04-2978fje (2005).
- 133 Curnow, S. J., Fairclough, M., Schmutz, C. & Kissane, S. Distinct types of fibrocyte can differentiate from mononuclear cells in the presence and absence of serum. *PloS one*, doi:10.1371/journal.pone.0009730 (2010).
- 134 Hinz, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *The Journal of investigative dermatology* **127**, 526-537, doi:10.1038/sj.jid.5700613 (2007).
- 135 Reilkoff, R. A., Bucala, R. & Herzog, E. L. Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation. *Nature reviews. Immunology* **11**, 427-435, doi:10.1038/nri2990 (2011).
- 136 Levenson, S. M. *et al.* THE HEALING OF RAT SKIN WOUNDS. *Annals of surgery* **161**, 293-308 (1965).
- 137 Glenn P, L. *et al.* Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers. *Wound Repair and Regeneration* **10**, 26-37, doi:10.1046/j.1524-475X.2002.10903.x (2002).

- 138 Elizabeth, A. B. & David, J. L. Proteinases, their inhibitors, and cytokine profiles in acute wound fluid. *Wound Repair and Regeneration* **8**, 392-398, doi:10.1111/j.1524-475X.2000.00392.x (2000).
- 139 Takuya, S., Ken, O. & Katsutoshi, Y. Characterization of a collagenolytic enzyme released from wounded planarians *Dugesia japonica*. *Wound Repair and Regeneration* **7**, 458-466, doi:10.1046/j.1524-475X.1999.00458.x (1999).
- 140 Grillo, H. C., Lapiere, C. M., Dresden, M. H. & Gross, J. Collagenolytic activity in regenerating forelimbs of the adult newt (*Triturus viridescens*). *Dev Biol* **17**, 571-583 (1968).
- 141 Miyazaki, K., Uchiyama, K., Imokawa, Y. & Yoshizato, K. Cloning and characterization of cDNAs for matrix metalloproteinases of regenerating newt limbs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 6819-6824 (1996).
- 142 Yang, E. V. & Bryant, S. V. Developmental regulation of a matrix metalloproteinase during regeneration of axolotl appendages. *Developmental biology* **166**, 696-703 (1994).
- 143 Nelson, K. K. & Melendez, J. A. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free radical biology & medicine* **37**, 768-784, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.008 (2004).
- 144 Nelson, K. K. *et al.* Redox-dependent matrix metalloproteinase-1 expression is regulated by JNK through Ets and AP-1 promoter motifs. *The Journal of biological chemistry* **281**, 14100-14110, doi:10.1074/jbc.M601820200 (2006).
- 145 Oshima, H., Rochat, A., Kedzia, C., Kobayashi, K. & Barrandon, Y. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell* **104**, 233-245 (2001).
- 146 Taylor, G., Lehrer, M. S., Jensen, P. J., Sun, T. T. & Lavker, R. M. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* **102**, 451-461 (2000).
- 147 Ito, M. *et al.* Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med* **11**, 1351-1354, doi:10.1038/nm1328 (2005).
- 148 Brownell, I., Guevara, E., Bai, C. B., Loomis, C. A. & Joyner, A. L. Nerve-derived sonic hedgehog defines a niche for hair follicle stem cells capable of becoming epidermal stem cells. *Cell stem cell* **8**, 552-565, doi:10.1016/j.stem.2011.02.021 (2011).
- 149 Tanaka, E. M., Drechsel, D. N. & Brockes, J. P. Thrombin regulates S-phase re-entry by cultured newt myotubes. *Current Biology* **9**, 792-799, doi:10.1016/S0960-9822(99)80362-5 (1999).
- 150 Del Rio-Tsonis, K., Washabaugh, C. H. & Tsonis, P. A. The mutant axolotl Short toes exhibits impaired limb regeneration and abnormal basement membrane formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 5502-5506 (1992).
- 151 Wallace, H. Vertebrate limb regeneration. *Vertebrate limb regeneration* (1981).
- 152 Christensen, R. N. & Tassava, R. A. Apical epithelial cap morphology and fibronectin gene expression in regenerating axolotl limbs. *Developmental Dynamics* **217**, 216-224, doi:10.1002/(SICI)1097-0177(200002)217:2<216::AID-DVDY8>3.0.CO;2-8 (2000).
- 153 Christen, B. & Slack, J. M. W. FGF-8Is Associated with Anteroposterior Patterning and Limb Regeneration in *Xenopus*. *Developmental biology* (1997).



- 154 Yokoyama, H., Ide, H. & Tamura, K. FGF-10 stimulates limb regeneration ability in *Xenopus laevis*. *Developmental biology*, doi:10.1006/dbio.2001.0180 (2001).
- 155 Mescher, A. L. Effects on adult newt limb regeneration of partial and complete skin flaps over the amputation surface. *Journal of Experimental Zoology*, doi:10.1002/jez.1401950111 (1976).
- 156 Kato, T. *et al.* Unique expression patterns of matrix metalloproteinases in regenerating newt limbs. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **226**, 366-376, doi:10.1002/dvdy.10247 (2003).
- 157 Brockes, J. P. & Kumar, A. Comparative aspects of animal regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**, 525-549, doi:10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175336 (2008).
- 158 Bosch, T. C. Why polyps regenerate and we don't: towards a cellular and molecular framework for Hydra regeneration. *Developmental biology* **303**, 421-433, doi:10.1016/j.ydbio.2006.12.012 (2007).
- 159 Newmark, P. A. & Sánchez Alvarado, A. Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics. *Nature reviews. Genetics* **3**, 210-219, doi:10.1038/nrg759 (2002).
- 160 Kragl, M. *et al.* Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature* **460**, 60-65, doi:10.1038/nature08152 (2009).
- 161 Sandoval-Guzmán, T. *et al.* Fundamental differences in dedifferentiation and stem cell recruitment during skeletal muscle regeneration in two salamander species. *Cell stem cell* **14**, 174-187, doi:10.1016/j.stem.2013.11.007 (2014).
- 162 Maden, M. & Holder, N. Axial characteristics of nerve induced supernumerary limbs in the axolotl. *Wilhelm Roux's archives of developmental biology* **193**, 394-401, doi:10.1007/BF00848230 (1984).
- 163 Niethammer, P., Grabher, C., Look, A. T. & Mitchison, T. J. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* **459**, 996-999, doi:10.1038/nature08119 (2009).
- 164 Gauron, C. *et al.* Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed. *Sci Rep* **3**, 2084, doi:10.1038/srep02084 (2013).
- 165 Love, N. R. *et al.* Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Nature cell biology* **15**, 222-228, doi:10.1038/ncb2659 (2013).
- 166 Rieger, S. & Sagasti, A. Hydrogen peroxide promotes injury-induced peripheral sensory axon regeneration in the zebrafish skin. *PLoS biology* **9**, doi:10.1371/journal.pbio.1000621 (2011).
- 167 Simon, H. U., Haj-Yehia, A. & Levi-Schaffer, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* **5**, 415-418 (2000).
- 168 Peiris, T. H., Hoyer, K. K. & Oviedo, N. J. J. Innate immune system and tissue regeneration in planarians: an area ripe for exploration. *Seminars in immunology* **26**, 295-302, doi:10.1016/j.smim.2014.06.005 (2014).
- 169 Godwin, J. W., Pinto, A. R. & Rosenthal, N. A. Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 9415-9420, doi:10.1073/pnas.1300290110 (2013).

- 170 Lévesque, M. *et al.* Transforming growth factor: beta signaling is essential for limb regeneration in axolotls. *PloS one* **2**, doi:10.1371/journal.pone.0001227 (2007).
- 171 Godwin, J. W. & Rosenthal, N. Scar-free wound healing and regeneration in amphibians: immunological influences on regenerative success. *Differentiation; research in biological diversity* **87**, 66-75, doi:10.1016/j.diff.2014.02.002 (2014).
- 172 Chen, G. & Robert, J. Antiviral immunity in amphibians. *Viruses* (2011).
- 173 Young, H. E., Bailey, C. F. & Dalley, B. K. Gross morphological analysis of limb regeneration in postmetamorphic adult Ambystoma. *The Anatomical Record*, doi:10.1002/ar.1092060308 (1983).
- 174 Seifert, A. W., Monaghan, J. R., Voss, S. R. & Maden, M. Skin regeneration in adult axolotls: a blueprint for scar-free healing in vertebrates. *PloS one*, doi:10.1371/journal.pone.0032875 (2012).
- 175 Ussing, A. P. & Rosenkilde, P. Effect of induced metamorphosis on the immune system of the Axolotl, Ambystoma mexicanum. *General and comparative endocrinology* (1995).
- 176 Manning, M. J. Histological organization of the spleen: implications for immune functions in amphibians. *Res Immunol* **142**, 355-359 (1991).
- 177 Bodemer, C. W. The development of nerve induced supernumerary limbs in the adult newt, Triturus viridescens. *Journal of Morphology* **102**, 555-581 (1958).
- 178 Brockes, J. P. Mitogenic growth factors and nerve dependence of limb regeneration. *Science* **225**, 1280-1287 (1984).
- 179 Tetsuya, E., Susan, V. B. & David, M. G. A stepwise model system for limb regeneration. *Developmental Biology*, doi:10.1016/j.ydbio.2004.02.016 (2003).
- 180 Makanae, A., Hirata, A., Honjo, Y., Mitogawa, K. & Satoh, A. Nerve independent limb induction in axolotls. *Developmental biology* **381**, 213-226, doi:10.1016/j.ydbio.2013.05.010 (2013).
- 181 Singer, M. The nervous system and regeneration of the forelimb of adult Triturus; a further study of the importance of nerve number, including quantitative measurements of limb innervation. *The Journal of experimental zoology* **104**, 223-249 (1947).
- 182 Globus, M., Smith, M. J. & Vethamany-Globus, S. Evidence supporting a mitogenic role for substance P in amphibian limb regeneration. Involvement of the inositol phospholipid signaling pathway. *Annals of the New York Academy of Sciences* **632**, 396-399 (1991).
- 183 Brockes, J. P. & Kintner, C. R. Glial growth factor and nerve-dependent proliferation in the regeneration blastema of Urodele amphibians. *Cell* **45**, 301-306, doi:10.1016/0092-8674(86)90394-6 (1986).
- 184 Bryant, S. V., Torok, M. A., Blumberg, B. & Gardiner, D. M. Nerve dependency of regeneration: the role of Distal-less and FGF signaling in amphibian limb regeneration. ... (1996).
- 185 Kumar, A., Godwin, J. W., Gates, P. B., Garza-Garcia, A. A. & Brockes, J. P. Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate. *Science* **318**, 772-777, doi:10.1126/science.1147710 (2007).
- 186 Blassberg, R. A. & Garza-Garcia, A. Functional convergence of signalling by GPI-anchored and anchorless forms of a salamander protein implicated in limb regeneration. *Journal of cell ...*, doi:10.1242/jcs.076331 (2011).
- 187 Nakamura, T., Mito, T., Miyawaki, K., Ohuchi, H. & Noji, S. EGFR signaling is required for re-establishing the proximodistal axis during distal leg regeneration

- in the cricket *Gryllus bimaculatus* nymph. *Developmental biology* **319**, 46-55, doi:10.1016/j.ydbio.2008.04.002 (2008).
- 188 Mariana, G. S. *et al.* Denervation impairs regeneration of amputated zebrafish fins. *BMC Developmental Biology* **14**, 49, doi:10.1186/s12861-014-0049-2 (2014).
- 189 Yazawa, S., Umesono, Y. & Hayashi, T. Planarian Hedgehog/Patched establishes anterior-posterior polarity by regulating Wnt signaling. *Proceedings of the ...* (2009).
- 190 Miljkovic-Licina, M., Chera, S., Ghila, L. & Galliot, B. Head regeneration in wild-type hydra requires de novo neurogenesis. *Development*, doi:10.1242/dev.02804 (2007).
- 191 Aberger, F., Weidinger, G., Grunz, H. & Richter, K. Anterior specification of embryonic ectoderm: the role of the *Xenopus* cement gland-specific gene XAG-2. *Mechanisms of development* (1998).
- 192 Tanaka, E. & Galliot, B. Triggering the regeneration and tissue repair programs. *Development* **136**, 349-353, doi:10.1242/dev.031682 (2009).
- 193 Blasi, F. & Carmeliet, P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**, 932-943, doi:10.1038/nrm977 (2002).
- 194 Illingworth, C. M. Trapped fingers and amputated finger tips in children. *Journal of pediatric surgery*, doi:10.1016/S0022-3468(74)80220-4 (1974).
- 195 Porrello, E. R., Mahmoud, A. I., Simpson, E. & Hill, J. A. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science*, doi:10.1126/science.1200708 (2011).
- 196 Jesty, S. A., Steffey, M. A. & Lee, F. K. c-kit<sup>+</sup> precursors support postinfarction myogenesis in the neonatal, but not adult, heart. *Proceedings of the ...*, doi:10.1073/pnas.1208114109 (2012).
- 197 Schelonka, R. L. & Infante, A. J. Neonatal immunology. *Semin Perinatol* **22**, 2-14 (1998).
- 198 Taub, R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**, 836-847, doi:10.1038/nrm1489 (2004).
- 199 Stanger, B. Z. Cellular homeostasis and repair in the mammalian liver. *Annual review of physiology* **77**, 179-200, doi:10.1146/annurev-physiol-021113-170255 (2015).
- 200 Ding, B.-S. S. *et al.* Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature* **468**, 310-315, doi:10.1038/nature09493 (2010).
- 201 Forbes, S. J. & Rosenthal, N. Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy. *Nat Med* **20**, 857-869, doi:10.1038/nm.3653 (2014).
- 202 Chargé, S. B. & Rudnicki, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological reviews* **84**, 209-238, doi:10.1152/physrev.00019.2003 (2004).
- 203 Merly, F., Lescaudron, L., Rouaud, T., Crossin, F. & Gardahaut, M. F. Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve* **22**, 724-732 (1999).
- 204 Muñoz-Cánoves, P. & Serrano, A. L. Macrophages decide between regeneration and fibrosis in muscle. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **26**, 449-450, doi:10.1016/j.tem.2015.07.005 (2015).

- 205 Arnold, L., Henry, A., Poron, F. & Baba-Amer, Y. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *The Journal of ...* (2007).
- 206 Tidball, J. G. & Villalta, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *{Foster, 2006 #157}* **298**, R1173-1187, doi:10.1152/ajpregu.00735.2009 (2010).
- 207 Heredia, J. E., Mukundan, L., Chen, F. M. & Mueller, A. A. Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell* (2013).
- 208 Joe, A. W. B. *et al.* Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nature Cell Biology* **12**, 153-163, doi:10.1038/ncb2015 (2010).
- 209 Uezumi, A., Fukada, S.-i., Yamamoto, N., Takeda, S. i. & Tsuchida, K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nature cell biology* **12**, 143-152, doi:10.1038/ncb2014 (2010).
- 210 Pinto, A. R., Godwin, J. W. & Rosenthal, N. A. Macrophages in cardiac homeostasis, injury responses and progenitor cell mobilisation. *Stem cell research* **13**, 705-714, doi:10.1016/j.scr.2014.06.004 (2014).
- 211 Renault, V., Thornell, L. E., Eriksson, P. O., Butler-Browne, G. & Mouly, V. Regenerative potential of human skeletal muscle during aging (vol 1, pg 132, 2002). *Aging Cell* **2**, 71-71 (2003).
- 212 Mann, C. J., Perdiguero, E. & Kharraz, Y. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skeletal ...*, doi:10.1186/2044-5040-1-21 (2011).
- 213 Rodgers, J. T. *et al.* mTORC1 controls the adaptive transition of quiescent stem cells from G0 to G(Alert). *Nature* **510**, 393-396, doi:10.1038/nature13255 (2014).
- 214 Seifert, A. W. *et al.* Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*). *Nature* **489**, 561-565, doi:10.1038/nature11499 (2012).
- 215 Brant, J. O., Yoon, J. H., Polvadore, T., Barbazuk, W. B. & Maden, M. Cellular events during scar-free skin regeneration in the spiny mouse, *Acomys*. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, doi:10.1111/wrr.12385 (2015).
- 216 Andrews, B. S. *et al.* Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *The Journal of experimental medicine* **148**, 1198-1215 (1978).
- 217 Altman, A., Theofilopoulos, A. N., Weiner, R., Katz, D. H. & Dixon, F. J. Analysis of T cell function in autoimmune murine strains. Defects in production and responsiveness to interleukin 2. *The Journal of experimental medicine* **154**, 791-808 (1981).
- 218 Theofilopoulos, A. N. & Lawson, B. R. Tumour necrosis factor and other cytokines in murine lupus. *Annals of the rheumatic diseases* **58 Suppl 1**, 55 (1999).
- 219 Naviaux, R. K. *et al.* Retained features of embryonic metabolism in the adult MRL mouse. *Molecular genetics and metabolism* **96**, 133-144, doi:10.1016/j.ymgme.2008.11.164 (2009).
- 220 Clark, L. D., Clark, R. K. & Heber-Katz, E. A new murine model for mammalian wound repair and regeneration. *Clinical immunology and ...*, doi:10.1006/clin.1998.4519 (1998).

- 221 Samulewicz, S. J., Seitz, A. & Clark, L. Expression of preadipocyte factor-1 (Pref-1), a delta-like protein, in healing mouse ears. *Wound repair and ...*, doi:10.1046/j.1524-475X.2002.10404.x (2002).
- 222 Leferovich, J. M. *et al.* Heart regeneration in adult MRL mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 9830-9835, doi:10.1073/pnas.181329398 (2001).
- 223 Neill, J. T., Scott, A. J. & Stephen, F. B. A histomorphologic study of the normal healing response following digit amputation in C57bl/6 and MRL/MpJ mice. *Archives of Histology and Cytology* **73**, 103111, doi:10.1679/aohc.73.103 (2011).
- 224 Gourevitch, D. *et al.* Matrix metalloproteinase activity correlates with blastema formation in the regenerating MRL mouse ear hole model. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **226**, 377-387, doi:10.1002/dvdy.10243 (2003).
- 225 Buckley, G., Wong, J., Metcalfe, A. D. & Ferguson, M. W. Denervation affects regenerative responses in MRL/MpJ and repair in C57BL/6 ear wounds. *J Anat* **220**, 3-12, doi:10.1111/j.1469-7580.2011.01452.x (2012).
- 226 Zoukhri, D. & Kublin, C. L. Impaired neurotransmitter release from lacrimal and salivary gland nerves of a murine model of Sjögren's syndrome. *Investigative ophthalmology & visual science* **42**, 925-932 (2001).
- 227 Breneman, S. M., Moynihan, J. A., Grotta, L. J., Felten, D. L. & Felten, S. Y. Splenic norepinephrine is decreased in MRL-lpr/lpr mice. *Brain, behavior, and immunity* **7**, 135-143, doi:10.1006/brbi.1993.1015 (1993).
- 228 Felten, D. L., Ackerman, K. D., Wiegand, S. J. & Felten, S. Y. Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen: I. Nerve fibers associate with lymphocytes and macrophages in specific compartments of the splenic white pulp. *J Neurosci Res* **18**, 28-36, 118-121 (1987).
- 229 Ackerman, K. D., Madden, K. S., Livnat, S., Felten, S. Y. & Felten, D. L. Neonatal sympathetic denervation alters the development of in vitro spleen cell proliferation and differentiation. *Brain, behavior, and immunity* **5**, 235-261 (1991).
- 230 Levite, M. Nerve-driven immunity. The direct effects of neurotransmitters on T-cell function. *Annals of the New York Academy of Sciences* **917**, 307-321, doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb05397.x (2000).
- 231 Sternberg, E. M. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nature reviews. Immunology* **6**, 318-328, doi:10.1038/nri1810 (2006).
- 232 Brogden, K. A., Guthmiller, J. M., Salzet, M. & Zasloff, M. The nervous system and innate immunity: the neuropeptide connection. *Nat Immunol* **6**, 558-564, doi:10.1038/ni1209 (2005).
- 233 Lundberg, J. M. Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol Rev* **48**, 113-178 (1996).
- 234 Brain, S. D. Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. *Immunopharmacology* **37**, 133-152, doi:10.1016/S0162-3109(97)00055-6 (1997).
- 235 Benemei, S., Nicoletti, P., Capone, J. G. & Geppetti, P. CGRP receptors in the control of pain and inflammation. *Current opinion in pharmacology* **9**, 9-14, doi:10.1016/j.coph.2008.12.007 (2009).

- 236 Sacerdote, P., Lechner, O., Sidman, C., Wick, G. & Panerai, A. E. Hypothalamic beta-endorphin concentrations are decreased in animals models of autoimmune disease. *J Neuroimmunol* **97**, 129-133 (1999).
- 237 Sherrington, C. S. Qualitative difference of spinal reflex corresponding with qualitative difference of cutaneous stimulus. *The Journal of physiology* **30**, 39, doi:10.1113/jphysiol.1903.sp000980 (1903).
- 238 Axelrod, F. B. & Gold-von Simson, G. Hereditary sensory and autonomic neuropathies: types II, III, and IV. *Orphanet journal of rare diseases* **2**, 39, doi:10.1186/1750-1172-2-39 (2007).
- 239 Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G. & Julius, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* **139**, 267-284, doi:10.1016/j.cell.2009.09.028 (2009).
- 240 van der Stelt, M. & Di Marzo, V. Anandamide as an intracellular messenger regulating ion channel activity. *Prostaglandins & other lipid mediators* **77**, 111-122, doi:10.1016/j.prostaglandins.2004.09.007 (2005).
- 241 Saghatelian, A., McKinney, M. K., Bandell, M., Patapoutian, A. & Cravatt, B. F. A FAAH-regulated class of N-acyl taurines that activates TRP ion channels. *Biochemistry* **45**, 9007-9015, doi:10.1021/bi0608008 (2006).
- 242 Marra, S. *et al.* Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids. *The EMBO journal* **35**, 414-428, doi:10.15252/embj.201592335 (2016).
- 243 Bautista, D. M. *et al.* TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* **124**, 1269-1282, doi:10.1016/j.cell.2006.02.023 (2006).
- 244 Marmigère, F. & Ernfors, P. Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage. *Nature reviews. Neuroscience* **8**, 114-127, doi:10.1038/nrn2057 (2007).
- 245 Stein, C. Opioid receptors on peripheral sensory neurons. *Adv Exp Med Biol* **521**, 69-76 (2003).
- 246 Stein, C. The control of pain in peripheral tissue by opioids. *The New England journal of medicine* **332**, 1685-1690, doi:10.1056/NEJM199506223322506 (1995).
- 247 Woolf, C. J. & Ma, Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron* **55**, 353-364, doi:10.1016/j.neuron.2007.07.016 (2007).
- 248 Liu, T., Gao, Y.-J. J. & Ji, R.-R. R. Emerging role of Toll-like receptors in the control of pain and itch. *Neuroscience bulletin* **28**, 131-144, doi:10.1007/s12264-012-1219-5 (2012).
- 249 Ibi, M. *et al.* Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 9486-9494, doi:10.1523/JNEUROSCI.1857-08.2008 (2008).
- 250 Holzer, P. Acid-sensitive ion channels in gastrointestinal function. *Current opinion in pharmacology* **3**, 618-625 (2003).
- 251 Watanabe, H. *et al.* Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* **424**, 434-438, doi:10.1038/nature01807 (2003).
- 252 Chuang, H. H. *et al.* Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* **411**, 957-962, doi:10.1038/35082088 (2001).
- 253 Chao, M. V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nature reviews. Neuroscience* **4**, 299-309, doi:10.1038/nrn1078 (2003).

- 254 Puehler, W. *et al.* Rapid upregulation of mu opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation depends on neuronal conduction. *Neuroscience* **129**, 473-479, doi:10.1016/j.neuroscience.2004.06.086 (2004).
- 255 Puehler, W. *et al.* Interleukin-1 beta contributes to the upregulation of kappa opioid receptor mrna in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation. *Neuroscience* **141**, 989-998, doi:10.1016/j.neuroscience.2006.03.078 (2006).
- 256 Beckett, A. H. & Casy, A. F. Stereochemistry of certain analgesics. *Nature* **173**, 1231-1232 (1954).
- 257 Pert, C. B. & Snyder, S. H. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* **179**, 1011-1014 (1973).
- 258 Goumon, Y. & Stefano, G. B. Identification of morphine in the rat adrenal gland. *Brain research. Molecular brain research* **77**, 267-269 (2000).
- 259 Laux, A. *et al.* Mapping of endogenous morphine-like compounds in the adult mouse brain: Evidence of their localization in astrocytes and GABAergic cells. *The Journal of comparative neurology* **519**, 2390-2416, doi:10.1002/cne.22633 (2011).
- 260 Grobe, N. *et al.* Urinary excretion of morphine and biosynthetic precursors in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 8147-8152, doi:10.1073/pnas.1003423107 (2010).
- 261 Zhu, W., Cadet, P., Baggerman, G., Mantione, K. J. & Stefano, G. B. Human white blood cells synthesize morphine: CYP2D6 modulation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **175**, 7357-7362 (2005).
- 262 Glattard, E. *et al.* Rethinking the opiate system? Morphine and morphine-6-glucuronide as new endocrine and neuroendocrine mediators. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* **12**, 7 (2006).
- 263 Goumon, Y. *et al.* Identification of morphine-6-glucuronide in chromaffin cell secretory granules. *The Journal of biological chemistry* **281**, 8082-8089, doi:10.1074/jbc.M502298200 (2006).
- 264 Grobe, N., Ren, X., Kutchan, T. M. & Zenk, M. H. An (R)-specific N-methyltransferase involved in human morphine biosynthesis. *Archives of biochemistry and biophysics* **506**, 42-47, doi:10.1016/j.abb.2010.11.010 (2011).
- 265 Brix-Christensen, V., Tønnesen, E., Sanchez, R. G., Bilfinger, T. V. & Stefano, G. B. Endogenous morphine levels increase following cardiac surgery as part of the antiinflammatory response? *International journal of cardiology* **62**, 191-197 (1997).
- 266 Pasternak, G. W. & Snyder, S. H. Identification of novel high affinity opiate receptor binding in rat brain. *Nature* **253**, 563-565 (1975).
- 267 Terenius, L. & Wahlström, A. Search for an endogenous ligand for the opiate receptor. *Acta physiologica Scandinavica* **94**, 74-81, doi:10.1111/j.1748-1716.1975.tb05863.x (1975).
- 268 Hughes, J. *et al.* Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* **258**, 577-580 (1975).
- 269 Gubler, U., Seeburg, P., Hoffman, B. J., Gage, L. P. & Udenfriend, S. Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides. *Nature* **295**, 206-208 (1982).
- 270 Rossier, J. [Biosynthesis of opioid peptides]. *Ann Endocrinol (Paris)* **49**, 371-373 (1988).

- 271 Irazusta, J., Larrinaga, G., Agirregoitia, N., Varona, A. & Casis, L. Effects of morphine administration and its withdrawal on rat brain aminopeptidase activities. *Regulatory peptides* **110**, 225-230 (2003).
- 272 Hersh, L. B. Reaction of opioid peptides with neutral endopeptidase ("enkephalinase"). *J Neurochem* **43**, 487-493 (1984).
- 273 Lukiw, W. J. Endogenous signaling complexity in neuropeptides- leucine- and methionine-enkephalin. *Cellular and molecular neurobiology* **26**, 1003-1010, doi:10.1007/s10571-006-9100-6 (2006).
- 274 Salzet, M. & Tasiemski, A. Involvement of pro-enkephalin-derived peptides in immunity. *Developmental and comparative immunology* **25**, 177-185, doi:10.1016/S0145-305X(00)00047-1 (2001).
- 275 McLaughlin, P. J. & Zagon, I. S. The opioid growth factor-opioid growth factor receptor axis: homeostatic regulator of cell proliferation and its implications for health and disease. *Biochemical pharmacology* **84**, 746-755, doi:10.1016/j.bcp.2012.05.018 (2012).
- 276 Bloom, F. E. *et al.* beta-endorphin: cellular localization, electrophysiological and behavioral effects. *Adv Biochem Psychopharmacol* **18**, 89-109 (1978).
- 277 de Wied, D. Neurotrophic effects of ACTH/MSH neuropeptides. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **50**, 353-366 (1990).
- 278 Deakin, J. F., Doströvsky, J. O. & Smyth, D. G. Influence of N-terminal acetylation and C-terminal proteolysis on the analgesic activity of beta-endorphin. *The Biochemical journal* **189**, 501-506 (1980).
- 279 Seizinger, B. R., Holtt, V. & Herz, A. Proenkephalin B (prodynorphin)-derived opioid peptides: evidence for a differential processing in lobes of the pituitary. *Endocrinology* **115**, 662-671, doi:10.1210/endo-115-2-662 (1984).
- 280 Le Merrer, J., Becker, J. A. A., Befort, K. & Kieffer, B. L. Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiological reviews* **89**, 1379-1412, doi:10.1152/physrev.00005.2009 (2009).
- 281 Pol, O., Palacio, J. R. R. & Puig, M. M. The expression of delta- and kappa-opioid receptor is enhanced during intestinal inflammation in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **306**, 455-462, doi:10.1124/jpet.103.049346 (2003).
- 282 Holzer, P. Opioid receptors in the gastrointestinal tract. *Regulatory peptides* **155**, 11-17, doi:10.1016/j.regpep.2009.03.012 (2009).
- 283 Bigliardi, P. L., Bigliardi-Qi, M., Buechner, S. & Ruffli, T. Expression of mu-opiate receptor in human epidermis and keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* **111**, 297-301, doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00259.x (1998).
- 284 Stein, C. & Lang, L. J. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Current opinion in pharmacology* **9**, 3-8, doi:10.1016/j.coph.2008.12.009 (2009).
- 285 Evans, C. J., Keith, D. E., Jr., Morrison, H., Magendzo, K. & Edwards, R. H. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* **258**, 1952-1955 (1992).
- 286 Kieffer, B. L., Befort, K., Gaveriaux-Ruff, C. & Hirth, C. G. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 12048-12052 (1992).
- 287 Larhammar, D., Bergqvist, C. & Sundström, G. Ancestral vertebrate complexity of the opioid system. *Vitamins and hormones* **97**, 95-122, doi:10.1016/bs.vh.2014.11.001 (2015).



- 288 Wang, J. B. *et al.* Human mu opiate receptor. cDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment. *FEBS letters* **338**, 217-222 (1994).
- 289 Simonin, F. *et al.* The human delta-opioid receptor: genomic organization, cDNA cloning, functional expression, and distribution in human brain. *Mol Pharmacol* **46**, 1015-1021 (1994).
- 290 Befort, K., Mattéi, M. G., Roeckel, N. & Kieffer, B. Chromosomal localization of the delta opioid receptor gene to human 1p34.3-p36.1 and mouse 4D bands by in situ hybridization. *Genomics* **20**, 143-145 (1994).
- 291 Stevens, C. W. The evolution of vertebrate opioid receptors. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* **14**, 1247-1269 (2009).
- 292 Connor, M. & Christie, M. D. Opioid receptor signalling mechanisms. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* **26**, 493-499 (1999).
- 293 Chaturvedi, K., Christoffers, K. H., Singh, K. & Howells, R. D. Structure and regulation of opioid receptors. *Biopolymers* **55**, 334-346, doi:10.1002/1097-0282(2000)55:4<334::AID-BIP1006>3.0.CO;2-S (2000).
- 294 Goldstein, A., Tachibana, S., Lowney, L. I., Hunkapiller, M. & Hood, L. Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 6666-6670 (1979).
- 295 Bigliardi, P. L., Neumann, C., Teo, Y. L., Pant, A. & Bigliardi-Qi, M. Activation of the delta-opioid receptor promotes cutaneous wound healing by affecting keratinocyte intercellular adhesion and migration. *Br J Pharmacol* **172**, 501-514, doi:10.1111/bph.12687 (2015).
- 296 Gavériaux, C., Peluso, J., Simonin, F., Laforet, J. & Kieffer, B. Identification of kappa- and delta-opioid receptor transcripts in immune cells. *FEBS letters* **369**, 272-276, doi:10.1016/0014-5793(95)00766-3 (1995).
- 297 Bénard, A. *et al.* Delta opioid receptors mediate chemotaxis in bone marrow-derived dendritic cells. *Journal of neuroimmunology* **197**, 21-28, doi:10.1016/j.jneuroim.2008.03.020 (2008).
- 298 Chen, Y., Mestek, A., Liu, J. & Yu, L. Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors. *The Biochemical journal* **295 ( Pt 3)**, 625-628 (1993).
- 299 Meunier, J. C. *et al.* Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* **377**, 532-535, doi:10.1038/377532a0 (1995).
- 300 Chan, J. S., Chiu, T. T. & Wong, Y. H. Activation of type II adenylyl cyclase by the cloned mu-opioid receptor: coupling to multiple G proteins. *J Neurochem* **65**, 2682-2689 (1995).
- 301 Shen, K. F. & Crain, S. M. Dual opioid modulation of the action potential duration of mouse dorsal root ganglion neurons in culture. *Brain research* **491**, 227-242 (1989).
- 302 Chakrabarti, S., Regec, A. & Gintzler, A. R. Biochemical demonstration of mu-opioid receptor association with G $\alpha$ : enhancement following morphine exposure. *Brain research. Molecular brain research* **135**, 217-224, doi:10.1016/j.molbrainres.2004.12.016 (2005).
- 303 Galeotti, N., Stefano, G. B., Guarna, M., Bianchi, E. & Ghelardini, C. Signaling pathway of morphine induced acute thermal hyperalgesia in mice. *Pain* **123**, 294-305, doi:10.1016/j.pain.2006.03.008 (2006).

- 304 Tegeder, I. & Geisslinger, G. Opioids as modulators of cell death and survival--unraveling mechanisms and revealing new indications. *Pharmacological reviews* **56**, 351-369, doi:10.1124/pr.56.3.2 (2004).
- 305 Li, Y. *et al.* Morphine induces desensitization of insulin receptor signaling. *Molecular and cellular biology* **23**, 6255-6266, doi:10.1128/MCB.23.17.6255-6266.2003 (2003).
- 306 Fan, T. *et al.* A role for the distal carboxyl tails in generating the novel pharmacology and G protein activation profile of mu and delta opioid receptor hetero-oligomers. *J Biol Chem* **280**, 38478-38488, doi:10.1074/jbc.M505644200 (2005).
- 307 Gomes, I. *et al.* A role for heterodimerization of mu and delta opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 5135-5139, doi:10.1073/pnas.0307601101 (2004).
- 308 Chen, C. *et al.* Heterodimerization and cross-desensitization between the mu-opioid receptor and the chemokine CCR5 receptor. *European journal of pharmacology* **483**, 175-186 (2004).
- 309 Pfeiffer, M. *et al.* Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization. *The Journal of biological chemistry* **277**, 19762-19772, doi:10.1074/jbc.M110373200 (2002).
- 310 Vilardaga, J.-P. P. *et al.* Conformational cross-talk between alpha2A-adrenergic and mu-opioid receptors controls cell signaling. *Nature chemical biology* **4**, 126-131, doi:10.1038/nchembio.64 (2008).
- 311 Pfeiffer, M. *et al.* Heterodimerization of substance P and mu-opioid receptors regulates receptor trafficking and resensitization. *The Journal of biological chemistry* **278**, 51630-51637, doi:10.1074/jbc.M307095200 (2003).
- 312 Hasbi, A. *et al.* Desensitization of the delta-opioid receptor correlates with its phosphorylation in SK-N-BE cells: involvement of a G protein-coupled receptor kinase. *Journal of neurochemistry* **70**, 2129-2138 (1998).
- 313 Marie, N., Aguila, B. & Allouche, S. Tracking the opioid receptors on the way of desensitization. *Cellular signalling* **18**, 1815-1833, doi:10.1016/j.cellsig.2006.03.015 (2006).
- 314 Rittner, H. L. *et al.* Antinociception by neutrophil-derived opioid peptides in noninflamed tissue--role of hypertonicity and the perineurium. *Brain Behav Immun* **23**, 548-557, doi:10.1016/j.bbi.2009.02.007 (2009).
- 315 Stein, C., Gramsch, C. & Herz, A. Intrinsic mechanisms of antinociception in inflammation: local opioid receptors and beta-endorphin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **10**, 1292-1298 (1990).
- 316 Stein, C., Hassan, A. H., Lehrberger, K., Giefing, J. & Yassouridis, A. Local analgesic effect of endogenous opioid peptides. *Lancet (London, England)* **342**, 321-324 (1993).
- 317 Pohl, M. *et al.* Expression of preproenkephalin A gene and presence of Met-enkephalin in dorsal root ganglia of the adult rat. *Journal of neurochemistry* **63**, 1226-1234 (1994).
- 318 Braz, J. *et al.* Therapeutic efficacy in experimental polyarthritis of viral-driven enkephalin overproduction in sensory neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**, 7881-7888 (2001).

- 319 Obara, I. *et al.* Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain. *Pain* **141**, 283-291, doi:10.1016/j.pain.2008.12.006 (2009).
- 320 Gaveriaux-Ruff, C. *et al.* Genetic ablation of delta opioid receptors in nociceptive sensory neurons increases chronic pain and abolishes opioid analgesia. *Pain* **152**, 1238-1248, doi:10.1016/j.pain.2010.12.031 (2011).
- 321 Labuz, D., Mousa, S. A., Schäfer, M., Stein, C. & Machelska, H. Relative contribution of peripheral versus central opioid receptors to antinociception. *Brain research* **1160**, 30-38, doi:10.1016/j.brainres.2007.05.049 (2007).
- 322 Pettinger, L., Gigout, S., Linley, J. E. & Gamper, N. Bradykinin controls pool size of sensory neurons expressing functional  $\delta$ -opioid receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**, 10762-10771, doi:10.1523/JNEUROSCI.0123-13.2013 (2013).
- 323 Shaqura, M. *et al.* New insights into mechanisms of opioid inhibitory effects on capsaicin-induced TRPV1 activity during painful diabetic neuropathy. *Neuropharmacology* **85**, 142-150, doi:10.1016/j.neuropharm.2014.05.026 (2014).
- 324 Stein, C. & Machelska, H. Modulation of peripheral sensory neurons by the immune system: implications for pain therapy. *Pharmacological reviews* **63**, 860-881, doi:10.1124/pr.110.003145 (2011).
- 325 Brack, A. *et al.* Tissue monocytes/macrophages in inflammation: hyperalgesia versus opioid-mediated peripheral antinociception. *Anesthesiology* **101**, 204-211 (2004).
- 326 Rittner, H. L. *et al.* Neurokinin-1 receptor antagonists inhibit the recruitment of opioid-containing leukocytes and impair peripheral antinociception. *Anesthesiology* **107**, 1009-1017, doi:10.1097/01.anes.0000291454.90754.de (2007).
- 327 Rittner, H. L. *et al.* CXCR1/2 ligands induce p38 MAPK-dependent translocation and release of opioid peptides from primary granules in vitro and in vivo. *Brain, behavior, and immunity* **21**, 1021-1032, doi:10.1016/j.bbi.2007.05.002 (2007).
- 328 Cabot, P. J., Carter, L., Schafer, M. & Stein, C. Methionine-enkephalin-and Dynorphin A-release from immune cells and control of inflammatory pain. *Pain* **93**, 207-212 (2001).
- 329 Rittner, H. L. *et al.* Mycobacteria attenuate nociceptive responses by formyl peptide receptor triggered opioid peptide release from neutrophils. *PLoS Pathog* **5**, e1000362, doi:10.1371/journal.ppat.1000362 (2009).
- 330 Sauer, R. S. *et al.* Toll like receptor (TLR)-4 as a regulator of peripheral endogenous opioid-mediated analgesia in inflammation. *Mol Pain* **10**, 10, doi:10.1186/1744-8069-10-10 (2014).
- 331 Zurawski, G. *et al.* Activation of mouse T-helper cells induces abundant preproenkephalin mRNA synthesis. *Science* **232**, 772-775 (1986).
- 332 Lyons, P. D. & Blalock, J. E. Pro-opiomelanocortin gene expression and protein processing in rat mononuclear leukocytes. *Journal of neuroimmunology* **78**, 47-56 (1997).
- 333 Busch-Dienstfertig, M., Labuz, D., Wolfram, T., Vogel, N. N. & Stein, C. JAK-STAT1/3-induced expression of signal sequence-encoding proopiomelanocortin mRNA in lymphocytes reduces inflammatory pain in rats. *Molecular pain* **8**, 83, doi:10.1186/1744-8069-8-83 (2012).

- 334 Boué, J. *et al.* Endogenous regulation of visceral pain via production of opioids by colitogenic CD4(+) T cells in mice. *Gastroenterology* **146**, 166-175, doi:10.1053/j.gastro.2013.09.020 (2014).
- 335 Sharp, B. M. Multiple opioid receptors on immune cells modulate intracellular signaling. *Brain Behav Immun* **20**, 9-14, doi:10.1016/j.bbi.2005.02.002 (2006).
- 336 Belkowski, S. M. *et al.* Detection of kappa-opioid receptor mRNA in immature T cells. *Adv Exp Med Biol* **373**, 11-16 (1995).
- 337 Apte, R. N., Durum, S. K. & Oppenheim, J. J. Opioids modulate interleukin-1 production and secretion by bone-marrow macrophages. *Immunol Lett* **24**, 141-148 (1990).
- 338 Sharp, B. M. *et al.* Opioid peptides rapidly stimulate superoxide production by human polymorphonuclear leukocytes and macrophages. *Endocrinology* **117**, 793-795, doi:10.1210/endo-117-2-793 (1985).
- 339 Wetzel, M. A. *et al.* Mu-opioid induction of monocyte chemoattractant protein-1, RANTES, and IFN-gamma-inducible protein-10 expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **165**, 6519-6524 (2000).
- 340 Chen, C., Farooqui, M. & Gupta, K. Morphine stimulates vascular endothelial growth factor-like signaling in mouse retinal endothelial cells. *Curr Neurovasc Res* **3**, 171-180 (2006).
- 341 Poonawala, T., Levay-Young, B. K., Hebbel, R. P. & Gupta, K. Opioids heal ischemic wounds in the rat. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* **13**, 165-174, doi:10.1111/j.1067-1927.2005.130207.x (2005).
- 342 Bigliardi-Qi, M. *et al.* Deletion of delta-opioid receptor in mice alters skin differentiation and delays wound healing. *Differentiation; research in biological diversity* **74**, 174-185, doi:10.1111/j.1432-0436.2006.00065.x (2006).
- 343 Rook, J. M. & McCarson, K. E. Delay of cutaneous wound closure by morphine via local blockade of peripheral tachykinin release. *Biochem Pharmacol* **74**, 752-757, doi:10.1016/j.bcp.2007.06.005 (2007).
- 344 Rook, J. M., Hasan, W. & McCarson, K. E. Morphine-induced early delays in wound closure: involvement of sensory neuropeptides and modification of neurokinin receptor expression. *Biochem Pharmacol* **77**, 1747-1755, doi:10.1016/j.bcp.2009.03.003 (2009).
- 345 Rook, J. M., Hasan, W. & McCarson, K. E. Temporal effects of topical morphine application on cutaneous wound healing. *Anesthesiology* **109**, 130-136, doi:10.1097/ALN.0b013e31817b5ac3 (2008).
- 346 Lam, C.-F. F. *et al.* Prolonged use of high-dose morphine impairs angiogenesis and mobilization of endothelial progenitor cells in mice. *Anesthesia and analgesia* **107**, 686-692, doi:10.1213/ane.0b013e31817e6719 (2008).
- 347 Zagon, I. S., Sassani, J. W. & McLaughlin, P. J. Reepithelialization of the human cornea is regulated by endogenous opioids. *Investigative ophthalmology & visual science* **41**, 73-81 (2000).
- 348 Zagon, I. S., Sassani, J. W., Immonen, J. A. & McLaughlin, P. J. Ocular surface abnormalities related to type 2 diabetes are reversed by the opioid antagonist naltrexone. *Clin Experiment Ophthalmol* **42**, 159-168, doi:10.1111/ceo.12144 (2014).
- 349 Immonen, J. A., Zagon, I. S., Lewis, G. S. & McLaughlin, P. J. Topical treatment with the opioid antagonist naltrexone accelerates the remodeling phase of full-

- thickness wound healing in type 1 diabetic rats. *Exp Biol Med (Maywood)* **238**, 1127-1135, doi:10.1177/1535370213502632 (2013).
- 350 Reece, A. S. Chronic ulcers caused by injection of substances: healing aided by naltrexone. *Archives of dermatology* **145**, 375-377, doi:10.1001/archdermatol.2009.4 (2009).
- 351 Stein, C. & Küchler, S. Targeting inflammation and wound healing by opioids. *Trends in pharmacological sciences* **34**, 303-312, doi:10.1016/j.tips.2013.03.006 (2013).
- 352 Torre, C., Perret, C. & Colnot, S. Molecular determinants of liver zonation. *Progress in molecular biology and translational science* **97**, 127-150, doi:10.1016/B978-0-12-385233-5.00005-2 (2010).
- 353 Teutsch, H. F. The modular microarchitecture of human liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **42**, 317-325, doi:10.1002/hep.20764 (2005).
- 354 Jiang, Y., Berry, D. C., Tang, W. & Graff, J. M. Independent stem cell lineages regulate adipose organogenesis and adipose homeostasis. *Cell reports* **9**, 1007-1022, doi:10.1016/j.celrep.2014.09.049 (2014).
- 355 Harms, M. & Seale, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature medicine* **19**, 1252-1263, doi:10.1038/nm.3361 (2013).
- 356 Qiu, Y. *et al.* Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell* **157**, 1292-1308, doi:10.1016/j.cell.2014.03.066 (2014).
- 357 Brestoff, J. R. *et al.* Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature* **519**, 242-246, doi:10.1038/nature14115 (2015).
- 358 Sun, K., Kusminski, C. M. & Scherer, P. E. Adipose tissue remodeling and obesity. *The Journal of clinical investigation* **121**, 2094-2101, doi:10.1172/JCI45887 (2011).
- 359 Brockes, J. P. & Kumar, A. Comparative aspects of animal regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**, 525-549, doi:10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175336 (2008).
- 360 James, J. M. & Mukouyama, Y.-s. S. Neuronal action on the developing blood vessel pattern. *Seminars in cell & developmental biology* **22**, 1019-1027, doi:10.1016/j.semcdb.2011.09.010 (2011).
- 361 Gourevitch, D. *et al.* Matrix metalloproteinase activity correlates with blastema formation in the regenerating MRL mouse ear hole model. *Dev Dyn* **226**, 377-387, doi:10.1002/dvdy.10243 (2003).
- 362 Sacerdote, P., Lechner, O., Sidman, C., Wick, G. & Panerai, A. E. Hypothalamic beta-Endorphin Concentrations Are Decreased in Animal Models of Autoimmune Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* **876**, 305-308, doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb07654.x (1999).
- 363 Vriza, S., Reiter, S. & Galliot, B. Cell death: a program to regenerate. *Curr Top Dev Biol* **108**, 121-151, doi:10.1016/B978-0-12-391498-9.00002-4 (2014).
- 364 Lämmermann, T. *et al.* Neutrophil swarms require LTB<sub>4</sub> and integrins at sites of cell death in vivo. *Nature* **498**, 371-375, doi:10.1038/nature12175 (2013).
- 365 Sheibanie, A. F. *et al.* The proinflammatory effect of prostaglandin E<sub>2</sub> in experimental inflammatory bowel disease is mediated through the IL-23-->IL-17 axis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **178**, 8138-8147 (2007).

- 366 Zhang, Y. *et al.* TISSUE REGENERATION. Inhibition of the prostaglandin-degrading enzyme 15-PGDH potentiates tissue regeneration. *Science (New York, N.Y.)* **348**, doi:10.1126/science.aaa2340 (2015).
- 367 Sacerdote, P., Lechner, O., Sidman, C., Wick, G. & Panerai, A. E. Hypothalamic beta-endorphin concentrations are decreased in animal models of autoimmune disease. *Ann N Y Acad Sci* **876**, 305-308, doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb07654.x (1999).
- 368 Guo, W., Imai, S., Dubner, R. & Ren, K. Multipotent stromal cells for arthritic joint pain therapy and beyond. *Pain Manag* **4**, 153-162, doi:10.2217/pmt.14.1 (2014).
- 369 Caviggioli, F., Vinci, V. & Codolini, L. Autologous fat grafting: an innovative solution for the treatment of post-mastectomy pain syndrome. *Breast cancer (Tokyo, Japan)* **20**, 281-282, doi:10.1007/s12282-013-0468-0 (2013).
- 370 Clark, J. D. *et al.* Morphine reduces local cytokine expression and neutrophil infiltration after incision. *Molecular pain* **3**, 28, doi:10.1186/1744-8069-3-28 (2007).
- 371 Martin, J. L. *et al.* Chronic morphine administration delays wound healing by inhibiting immune cell recruitment to the wound site. *The American journal of pathology* **176**, 786-799, doi:10.2353/ajpath.2010.090457 (2010).
- 372 Welters, I. D. *et al.* Morphine suppresses complement receptor expression, phagocytosis, and respiratory burst in neutrophils by a nitric oxide and mu(3) opiate receptor-dependent mechanism. *Journal of neuroimmunology* **111**, 139-145 (2000).
- 373 Tubaro, E. *et al.* Morphine and methadone impact on human phagocytic physiology. *Int J Immunopharmacol* **7**, 865-874 (1985).
- 374 Josefsson, E., Carlsten, H. & Tarkowski, A. Neutrophil mediated inflammatory response in murine lupus. *Autoimmunity* **14**, 251-257 (1993).
- 375 Pan, D. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Developmental cell* **19**, 491-505, doi:10.1016/j.devcel.2010.09.011 (2010).
- 376 Zhao, B., Tumaneng, K. & Guan, K.-L. L. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nature cell biology* **13**, 877-883, doi:10.1038/ncb2303 (2011).
- 377 Thompson, B. J. & Sahai, E. MST kinases in development and disease. *The Journal of cell biology* **210**, 871-882, doi:10.1083/jcb.201507005 (2015).
- 378 Elenkov, I. J. Neurohormonal-cytokine interactions: implications for inflammation, common human diseases and well-being. *Neurochemistry international* **52**, 40-51, doi:10.1016/j.neuint.2007.06.037 (2008).
- 379 Gawriluk, T. R. *et al.* Comparative analysis of ear-hole closure identifies epimorphic regeneration as a discrete trait in mammals. *Nature communications* **7**, 11164, doi:10.1038/ncomms11164 (2016).
- 380 Bair, M. J., Brizendine, E. J. & Ackermann, R. T. Prevalence of pain and association with quality of life, depression and glycaemic control in patients with diabetes. *Diabetic ...*, doi:10.1111/j.1464-5491.2010.02971.x (2010).
- 381 Gautam, S., Franzini, L., Mikhail, O. I., Chan, W. & Turner, B. J. Novel Measure of Opioid Dose and Costs of Care for Diabetes Mellitus: Opioid Dose and Health Care Costs. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* **17**, 319-327, doi:10.1016/j.jpain.2015.11.001 (2016).
- 382 Kumar, A., Nevill, G., Brockes, J. P. & Forge, A. A comparative study of gland cells implicated in the nerve dependence of salamander limb regeneration. *J Anat* **217**, 16-25, doi:10.1111/j.1469-7580.2010.01239.x (2010).

- 383 Turner, N. J., Johnson, S. A. & Badylak, S. F. A histomorphologic study of the normal healing response following digit amputation in C57bl/6 and MRL/MpJ mice. *Arch Histol Cytol* **73**, 103-111, doi:10.1679/aohc.73.103 (2010).
- l.





*Le plaisir est toujours un bien, et la douleur toujours un mal ;  
mais il n'est pas toujours avantageux de jouir du plaisir, et il est quelquefois  
avantageux de souffrir la douleur.*

*Nicolas Malebranche  
De la recherche de la vérité*





## Résumé :

Le tissu adipeux (TA) est connu pour sa plasticité puisqu'il est capable de s'hypertrophier ou de s'atrophier, en fonction de la situation métabolique de l'individu. Cette plasticité est liée au fait que le TA joue un double rôle dans le maintien de la balance énergétique : il est à la fois i) réserve d'énergie mobilisable (adipocytes blancs) mais également ii) consommateur d'énergie *via* la thermogénèse (adipocytes bruns, adipocytes beiges). En raison de l'évolution croissante des maladies métaboliques dites de surcharge dans lesquelles ce TA va s'hypertrophier, la majorité des études abordent cette notion de plasticité à l'échelle cellulaire, et se focalise ainsi sur les adipocytes (prolifération, différenciation, activité) et les autres populations cellulaires résidant dans le TA, capables d'interagir avec eux. En revanche, il y a très peu d'études sur cette plasticité à l'échelle tissulaire. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée i) à l'organisation tissulaire d'un dépôt de TA blanc (dépôt sous-cutané inguinal) et ii) les conséquences d'une ablation massive du TA blanc. L'ensemble de ce travail a été réalisé chez la souris. À l'aide de l'imagerie 3D sur tissu entier, nous montrons que ce dépôt est hétérogène : il est composé d'une partie dans laquelle il est possible de segmenter des entités fonctionnelles (lobules ?), située au cœur du dépôt, et d'une partie non segmentable, située à la périphérie du dépôt. Cette hétérogénéité structurale est associée à une hétérogénéité fonctionnelle : les deux régions se distinguent en termes de morphologie adipocytaire et de pattern d'expression génique. De plus, seule la partie segmentable répond à la mise au froid des animaux par une up-régulation du niveau d'expression d'Ucp1 et d'autres gènes marqueurs du « brunissement ». Parallèlement à cela, nous montrons que selon la souche de souris (C57bl6 et MRL), la réponse du TA inguinal à une ablation partielle n'est pas la même : chez la souris MRL (rare mammifère capable de régénération), ce dépôt adipeux est capable de régénérer, ce qui n'est pas le cas chez la souris C57Bl/6. La régénération est inhibée chez la souris MRL par un traitement avec un agoniste des récepteurs aux opioïdes (tramadol) alors qu'elle peut être induite chez la souris C57Bl/6 par un antagoniste de ces récepteurs (naloxone). Cette régénération est dépendante d'une forte et intense production d'espèces actives de l'oxygène par les granulocytes. L'utilisation de souris invalidées pour le récepteur  $\mu$  démontre l'implication de cette sous-famille de récepteurs. Enfin, cet effet des opioïdes est majoritairement le fait des cellules immunitaires, et plus particulièrement les granulocytes. Ces données mettent en exergue une nouvelle vision du TA blanc sous – cutané, qui ne doit pas être considéré comme un tissu inerte mais bel et bien comme un tissu hétérogène complexe (structurellement et fonctionnellement) pouvant être capable de régénération.

## Abstract :

Adipose tissue (AT) is very plastic tissue. During metabolic disease, it would be overdeveloped or atrophy. It is due to the fact that AT is i) energy storage thanks to white adipocyte and ii) energy consumer thanks to brown or brite adipocyte. The cellular composition is very well studied (adipocytes activity, proliferation, differentiation, link between AT stromal cells / adipocytes) but the tissue organization of AT is not known. During my thesis work, we study the i) tissular organization of white AT and ii) AT response after massive removal of white AT. Mice are used for this work. In the first step, our 3 dimensional imaging of white AT shows that AT is heterogeneous tissue: AT has 2 components: segmentable area, in the AT core and non-segmentable area, in the AT periphery. This structural heterogeneity is correlated with functional heterogeneity because segmentable area differs to non-segmentable area from adipocyte shape and pattern genic expression. Furthermore, only segmentable area can be respond to cold exposure by Ucp1 up-regulation and browning genes markers. In the second step, massive ablation of subcutaneous white AT is performed on two mice strains: C57Bl/6 and MRL (known to be able to regenerate). MRL mice inguinal AT regenerate, unlike inguinal AT of C57Bl/6 mice. The use of antagonist of opioid receptor (naloxone) treatment leads regeneration AT in C57Bl/6. In opposite, opioid receptor agonist (tramadol) treatment in MRL mice inhibits AT regeneration. AT regeneration is dependant of burst oxydatif production by granulocytes. The use of the  $\mu$  receptor knock down mice highlights that is the only  $\mu$  receptor is involved in AT regeneration. More precisely, opioids effects are mediated by  $\mu$  receptor on granulocyte immune cells. Our data highlight the new global vision of white AT. This tissue cannot consider as inert tissue but as a heterogeneous and complex tissue, which could be regenerate.